

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-117787

(43) 公開日 平成10年(1998) 5月12日

(51) Int.Cl.⁶ 識別記号 F I
C 1 2 N 15/09 Z N A C 1 2 N 15/00 Z N A A
A 6 1 K 38/46 C 0 7 K 14/745
38/48 C 1 2 N 9/64 Z
C 0 7 K 14/745 A 6 1 K 37/54
C 1 2 N 5/10 37/553
審査請求 有 発明の数 1 O L (全 47 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-247281
(62) 分割の表示 特願平6-276832の分割
(22) 出願日 昭和61年(1986) 4月16日

(31) 優先権主張番号 7 2 4 3 1 1
(32) 優先日 1985年4月17日
(33) 優先権主張国 米国 (US)
(31) 優先権主張番号 8 1 0 0 0 2
(32) 優先日 1985年12月16日
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 594185754
ザイモジェネティクス、インコーポレイテ
ィド
アメリカ合衆国、ワシントン 98103、シ
アトル、ノース サーティフィフス スト
リート、2121
(72) 発明者 フレデリック エス. ハーゲン
アメリカ合衆国、ワシントン 98105、シ
アトル、フォーティフォース ノース イ
ースト、3835
(74) 代理人 弁理士 青木 朗 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ファクター V I I 活性を有する蛋白質の製造方法

(57) 【要約】

【課題】 ファクター V I I a 活性を有する蛋白質の新規な製造手段。

【解決手段】 活性化後にファクター V I I a 活性を有する蛋白質をコードする D N A が挿入された哺乳類細胞を培養し、該培養液から蛋白質を得、これを活性化することを特徴とする方法。

【特許請求の範囲】

* 凝固のための生物学的活性を有する蛋白質の製造方法で

【請求項1】 ファクター VIIaにより介在される血液* あって、次のアミノ酸配列：

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg		
1	5	10
Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile		
	20	25
Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser		
	35	40
Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser		
	50	55
Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala		
	65	70
Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile		
	80	85
Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His		
	95	100
Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu		
	110	115
Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys		
	125	130
Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln		
	140	145
Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro		
	155	160
Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly		
	170	175
Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe		
	185	190
Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu		
	200	205
His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val		
	215	220
Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn		
	230	235
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr		
	245	250
Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu		
	260	265
Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly		
	275	280
Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu		
	290	295
Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg		
	305	310
Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala		
	320	325
Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly		
	335	340
Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly		
	350	355
		360

3	Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly	4
	365	370 375
	Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu	
	380	385 390
	Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe	
	395	400 405
	Pro	

を有するファクター VII a と同一の又は実質的に同一の血液凝固のための生物学的活性を活性化後に有する蛋白質をコードするヌクレオチド配列を含有するDNA造成物を含む哺乳類宿主細胞を適当な培地中で増殖せしめ；該哺乳類宿主細胞により生産された、前記DNA造成物によりコードされている蛋白質生成物を単離し；そして、

該蛋白質生成物を活性化して、ファクター VII a と同一の又は実質的に同一の血液凝固のための生物学的活性を有する蛋白質を生じさせる；ことを含んで成る方法。

【請求項2】 前記宿主細胞にジヒドロフォレートレダクターゼをコードする遺伝子を同時にトランスフェクトし、前記適当な培地にメトトレキサートを含有せしめることにより前記DNA造成物を増幅することを含む請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記蛋白質生成物を、ファクター XII a、ファクターIXa、カリクレイン、ファクターXa、及びトロンビンから成る群から選ばれた蛋白質分解酵素と反応せしめることにより該蛋白質生成物を活性化する請求項1に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】この発明は一般に血液凝固因子に関し、そしてさらに詳しくは血液凝固のための生物学的活性を有する蛋白質の発現に関する。

【0002】

【従来の技術】血液凝固は、最終的にフィブリンクロットを生じさせる種々の血液成分又は因子の複雑な相互作用から成る過程である。一般に、凝固“カスケード”と称される現象に関与する血液成分は酵素的に不活性な蛋白質たるプロエンザイム (proenzyme) 又はザイモゲン (zymogen) であり、この蛋白質は、それ自体活性化された凝固因子であるアクチベーター的作用により蛋白質分解酵素に転換される。このような転換を経験した凝固因子は一般に“活性化された因子”と称され、そして小文字の後付加記号“a”によって示される (例えば VII a)。

【0003】血液の凝固を助長しそしてそれによって正常な止血に関与する2つの別個の系が存在する。これらの系はイントリンシック (intrinsic) 凝固経路及びエキストリンシック (extrinsic) 凝固経路と称されている。イントリンシック経路は血漿中にのみ存在する因子の利用を介してトロンビン形成を導く反応を意味する。* 50

* イントリンシック経路における中間的現象としてファクターXI a及びカルシウムイオンにより触媒される反応であるファクターIXのファクターIXaへの活性化がある。次に、ファクターIXaは、ファクターVIII a、リン脂質及びカルシウムイオンの存在下でファクターXの活性化に関与する。

【0004】エキストリンシック経路は血漿因子、及び組織抽出物中に存在する成分を用いる。前に言及したプロエンザイムの1つであるファクターVII は、そのファクター VII aへの活性化の後に、組織因子及びカルシウムイオンの存在下でファクターXをXaに転換することにより、血液凝固のエキストリンシック経路に関与する。ファクターXaは今度はファクターVa、カルシウムイオン及びリン脂質の存在下でプロスロンビンをスロンビンに転換する。

【0005】ファクターXのファクターXaへの転換はイントリンシック経路及びエキストリンシック経路の両者に共通の現象であるから、ファクターVIIIが不足しているか又はファクターVIIIの阻害物質を有する患者の治療のためにファクター VII aを使用することができ (Thomas、米国特許No. 4, 382, 083)。さらに、ファクター VII aはファクターIXの活性化において役割を演ずることによりイントリンシック経路に関与することを示唆する証拠が存在する (Zur 及びNemerson, J. Biol. Chem. 253 : 2203-2209, 1978)。

【0006】実験的分析により、ヒトファクターVII が約50, 000ダルトンの分子量を有する単鎖糖蛋白質であることが明らかにされている。この形態において、この因子は不活性ザイモゲン (zymogen) として血液中を循環する。ファクターVII のファクター VII aへの活性化は幾つかの異なる血漿プロテアーゼ、例えばファクター XII aにより触媒される。ファクターVII の活性化により2個のポリペプチド鎖が形成され、これらは少なくとも1個のジスルフィド結合により一体化されたヘビー鎖 (Mr=28, 000) とライト鎖 (Mr=17, 000) とから成る。ファクターVII はまた、例えばThomas、米国特許No. 4, 456, 591により開示された方法によりイン-ビトロで VII aに活性化される。

【0007】ファクターIXは分子量57, 000の単鎖前駆体として血液中を循環し、そしてファクターVIIIの存在下でファクターXI aにより開裂された後活性なセリンプロテアーゼ (ファクターIXa) に転換される。ファ

クターIXaはそれぞれ16,000及び29,000の分子量を有するライト鎖及びヘビー鎖から成る。凝固異常(例えばファクターVIII及びIXの不足)を有する患者に対する最近の治療の実際は、富化されたレベルの特定の因子を含有するヒト血漿の冷却沈澱物(cryoprecipitate)又は他の画分による置換療法(replacement therapy)を用いる。これらの調製物は従来プールされたヒト血漿から得られていた。冷却沈澱物を調製するには出発材料として比較的多量のヒト血漿を使用する必要がある。

【0008】ファクターVIIの療法的使用は、ファクターVIIの不足を示す個体、並びにファクターVIII及びファクターIXが不足している個体群、及びVon Willebrand病を有する固体の治療においてなされる。置換療法においてファクターVIII及びIXを投与された個体はこれらの蛋白質に対する抗体をしばしば生じさせる。これらの抗体の存在のために連続治療は非常に困難である。この問題を経験する患者は通常、ファクターVIIaを含む活性凝固酵素及び不活性凝固酵素の混合物から成ることが知られている活性化されたプロスロンビン複合体により治療される。さらに、最近の研究により、少量(40~50 μ g)の注射されたファクターVIIaが、その血液に高レベルの抗体を有するファクターVIII不足の患者における重症の進行する出血を抑制するために有効であることが示されている(Hedner及びKisiel, J.Clin.Invest. 71:1836-1841, 1983)。

【0009】冷却沈澱物の調製に使用される血漿の入手源が多様であるため、調製物を試験してそれらがウイルス汚染を含まないことを保証することは困難である。例えば、冷却沈澱物を投与されたほとんどすべての者が肝炎試験において陽性を示す。さらに、最近の報告によれば、冷却沈澱物を投与された血友病患者において後天性免疫不全症候群(AIDS)が生じた。さらに、これらのファクターを多量に精製することは非常に困難であり、そして高価である。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】従って、ファクターVIIa及びファクターIXの純粋な調製物を比較的多量に製造するための方法が必要である。この発明はこのような必要を満たし、ウイルス感染の問題を好結果に除去し、そして同時に、ファクターVIII及びファクターIXが不足している患者並びにVon Willebrand病の個体を治療するための活性なファクターVIIaの一貫した且つ均質な入手源を提供し、そしてさらに置換療法において使用するための精製されたファクターIX源を提供するものである。

【0011】

【課題を解決するための手段】要約すれば、この発明は少なくとも部分的にファクターVIIをコードするヌクレオチド配列を含有するDNA造成物を開示する。このヌ

クレオチド配列はカルシウム結合ドメインをコードする第1ヌクレオチド配列及び該第1ヌクレオチド配列の下流に位置しこれと連結されている第2ヌクレオチド配列を含んで成る。この第2ヌクレオチド配列はファクターVIIaのセリンプロテアーゼ活性のための触媒ドメインをコードする。これらの連結された配列は、活性化後にファクターVIIaと実質上同一の血液凝固のための生物学的活性を有する蛋白質をコードする。第1ヌクレオチド配列は、実質的に、ファクターVII、ファクターIX、ファクターX、プロテインC、プロスロンビン又はプロテインSをコードする遺伝子のそれである。さらに、第1ヌクレオチドは前記遺伝子のそれぞれに対応するリーダーペプチドをもコードしていてもよい。

【0012】特に、第1ヌクレオチド配列はファクターVIIのゲノムクローン又はcDNAクローンに由来することができ、そしてファクターVIIのリーダーペプチド及びアミノ末端部分をコードすることができる。第1ヌクレオチド配列はさらに2本鎖オリゴヌクレオチドを含有することができる。特に好ましい第1ヌクレオチド配列はファクターIXのリーダーペプチド及びアミノ末端部分をコードするそれである。

【0013】さらに、この発明は哺乳類宿主細胞DNA中に取り込まれ得るプラスミドを開示する。これらのプラスミドの1つはプロモーター、その下流に続く1組のRNAスプライス部位、及びその下流に続く、少なくとも部分的にファクターVIIをコードするヌクレオチド配列を含有する。このヌクレオチド配列はカルシウム結合ドメインをコードする第1ヌクレオチド配列、及び該第1ヌクレオチド配列の下流に位置しこれと連結されている第2ヌクレオチド配列を含んで成る。この第2ヌクレオチド配列はファクターVIIaのセリンプロテアーゼ活性のための触媒ドメインをコードする。これらの連結された配列は、活性化後にファクターVIIaと実質的に同一の血液凝固のための生物学的活性を有する蛋白質をコードする。このヌクレオチド配列の下流にポリアデニレーションシグナルが続く。

【0014】上記の組換えプラスミドと同様に、この発明はさらに、プロモーター、その下流に続く1組のRNAスプライス部位、及びその下流に続く、少なくとも部分的にファクターIXをコードするヌクレオチド配列を含む第2のプラスミドを開示する。このヌクレオチド配列はカルシウム結合ドメインをコードする第1ヌクレオチド配列、及び該第1ヌクレオチド配列の下流に位置しこれと連結されている第2ヌクレオチド配列を含んで成る。この第2ヌクレオチド配列はファクターIXのセリンプロテアーゼ活性のための触媒ドメインをコードする。これらの連結された配列はファクターIXと実質上同一の血液凝固のための生物学的活性を有する蛋白質をコードする。このヌクレオチド配列の下流にはポリアデニレーションシグナルが続く。

【0015】この発明は第3の観点において、活性化後にファクター VII aと実質上同一の生物学的活性を有する蛋白質を生産するために安定にトランスフェクトされた哺乳類細胞を開示する。細胞が少なくとも部分的にファクターVII をコードするヌクレオチド配列を含有するDNA造成物によってトランスフェクトされる。このヌクレオチド配列はカルシウム結合ドメインをコードする第1ヌクレオチド配列、及び該第1ヌクレオチド配列の下流に位置しそれに連結されている第2ヌクレオチド配列を含んで成る。この第2ヌクレオチド配列はファクター VII aのセリンプロテアーゼ活性のための触媒ドメインをコードする。これらの連結された配列はファクター VII aと実質上同一の血液凝固のための生物学的活性を有する蛋白質をコードする。

【0016】この発明は他の観点において、ファクターIXと実質的に同一の生物学的活性を有する蛋白質を生産するために安定にトランスフェクトされた哺乳類細胞を開示する。細胞が少なくとも部分的にファクターIXをコードするヌクレオチド配列を含有するDNA造成物によってトランスフェクトされる。このヌクレオチド配列はカルシウム結合ドメインをコードする第1ヌクレオチド配列、及び該第1ヌクレオチド配列の下流に位置しそれと連結されている第2ヌクレオチド配列を含んで成る。この第2ヌクレオチド配列はファクターIXのセリンプロテアーゼ活性のための触媒ドメインをコードする。これらの連結された配列はファクターIXと実質的に同一の血液凝固のための生物学的活性を有する蛋白質をコードする。

【0017】この発明はさらに、少なくとも部分的にファクターVII をコードするヌクレオチド配列を含有するDNA造成物を含む哺乳類細胞を樹立することによって、ファクター VII aにより中介される血液凝固のための生物学的活性を有する蛋白質の製造方法を提供する。このヌクレオチド配列はカルシウム結合ドメインをコードする第1ヌクレオチド配列、及び該第1配列の下流に位置しそれに連結された第2ヌクレオチド配列を含んで成る。この第2ヌクレオチド配列はファクター VII aのセリンプロテアーゼ活性のための触媒ドメインをコードする。これらの連結された配列は、活性化後にファクター VII aと実質的に同一の生物学的活性を有する蛋白質をコードする。次に、この哺乳類細胞を適当な培地中で増殖せしめ、そして該DNA造成物によりコードされており且つ該哺乳動物細胞により生産された蛋白質生成物を単離する。次にこの蛋白質生成物を活性化してファクターVII aを生じさせる。

【0018】この発明は他の観点において、ファクターIXにより中介される血液凝固のための生物学的活性を有する蛋白質の製造方法を開示する。この方法は、少なくとも部分的にファクターIXをコードするヌクレオチド配列を含有するDNA造成物を含む哺乳類宿主細胞を樹立

することを含んで成る。このヌクレオチド配列はカルシウム結合ドメインをコードする第1ヌクレオチド配列、及び該第1ヌクレオチド配列の下流に位置しそれに連結されている第2ヌクレオチド配列を含んで成る。この第2ヌクレオチド配列はファクターIXのためのセリンプロテアーゼ活性のための触媒ドメインをコードする。これらの連結された配列はファクターIXと実質的に同一の血液凝固のための生物学的活性を有する蛋白質をコードする。次に、この哺乳類宿主細胞を適当な培地中で増殖せしめ、そして該宿主細胞によりコードされた蛋白質生成物を単離する。上記の方法により製造される蛋白質も開示される。

【0019】この発明の他の観点において、ファクターVII をコードするDNA配列を含んで成るDNA造成物を開示する。好ましい態様においては、このDNA配列は図4～図6中の第36塩基対から第1433塩基対までのcDNA配列を含んで成る。他の好ましい態様においては、DNA配列は図9中の第36塩基対から第99塩基対まで、及びその下流に続く第166塩基対から第1433塩基対までのcDNA配列を含んで成る。すぐ上に記載したDNA配列を含んで成り、哺乳類宿主細胞DNA中に組込まれ得る組換えプラスミドもまた開示される。

【0020】ファクターVII をコードするDNA配列を含んで成る組換え体プラスミドにより安定にトランスフェクトされた哺乳類細胞もまた開示される。好ましい態様においては、このDNA配列は図4～図6中の第36塩基対から第1433塩基対までのcDNA配列、又は図4～図6中の第33塩基対から第99塩基対まで及びその下流に続く第166塩基対から第1433塩基対までのcDNA配列を含んで成る。

【0021】上記のDNA造成物を含有する哺乳類宿主細胞を樹立することによって、ファクター VII aにより中介される血液凝固のための生物学的活性を有する蛋白質の製造方法もまた開示される。次に、哺乳類宿主細胞を適当な培地中で増殖せしめ、そしてDNA造成物によりコードされている蛋白質生成物を単離する。次に、この蛋白質生成物を活性化してファクター VII aを生じさせる。この発明の他の観点は、以下の詳細な説明及び添付図面により明らかになるであろう。

【0022】

【具体的な説明】この発明を記載する前に、以下に使用する幾つかの用語の定義を記載するのが発明の理解の助けとなろう。

相補的DNA又はcDNA：mRNA鋳型中に存在する配列から酵素的に合成されたDNA分子又は配列である。

【0023】DNA造成物：1本鎖又は2本鎖のDNA分子又はこのような分子のクローンであって、天然の遺伝子から単離することができるもの、又は天然には存在

しない態様で組合わされそして並置されるDNAのセグメントを含むように変形されているものである。

プラスミド又はベクター：宿主細胞に挿入された場合に複製することができ、遺伝情報を含有するDNA造成物である。プラスミドは一般に、宿主細胞中で発現されるべき少なくとも1個の遺伝子配列、並びにプロモーター及び転写開始部位を包含する、前記の遺伝子の発現を促進する配列を含有する。これは線状分子であっても閉環された分子であってもよい。

【0024】連結：1つの配列の5'及び3'末端が隣接する配列のそれぞれ3'及び5'末端にホスホジエステル結合によって付着されることを“連結される”と称する。連結は、平滑末端又は接着末端のリガーゼ連結のごとき方法により、cDNAクローニングによる連結された配列の合成により、又は指令された変異誘発(directed mutagenesis)の方法による介在配列の除去により達成することができる。

【0025】リーダーペプチド：幾つかの蛋白質のアミノ末端に存在しそしてプロセシング及び分泌の間に該蛋白質から一般に切断されるアミノ酸配列である。リーダーペプチドはその蛋白質を細胞の分泌経路に向ける配列を含んで成る。この明細書において使用する場合、“リーダーペプチド”なる語はさらに天然のリーダーペプチドの部分をも意味する。

【0026】ドメイン：その蛋白質のある生物学的活性のために必要な構造要素の全部又は部分を含有する蛋白質中の特定の複数のアミノ酸の3次元的自己集成的整列である。

生物学的活性：生物学的背景において(すなわち生物体中で又はインビトロの模倣において)分子によって達成される1つの機能又は1組の機能である。蛋白質の生物学的活性は触媒活性とエファクター活性とに分けることができる。凝固因子の触媒活性は一般に前駆体の特異的開裂による他の因子の活性化を含む。エファクター活性は、生物学的に活性な分子のカルシウムもしくは他の小分子への、蛋白質のごとき巨大分子への、又は細胞への特異的結合を含む。エファクター活性は生理的条件下での触媒活性をしばしば増強し、又は触媒活性のために必須である。触媒活性及びエファクター活性は幾つかの場合には蛋白質の同一のドメイン内に存在する。

【0027】ファクターVIIaについて、生物学的活性はエキシトリンシク経路による血液凝固の仲介によって特徴付けられるファクターVIIaはファクターXをファクターXaに活性化し、このファクターXaは今度はプロスロンビンをスロンビンに転換し、これによってフィブリンクロットの形成が開始される。ファクターXの活性化は血液凝固のイントリンシク経路及びエキシトリンシク経路に共通であるので、ファクターVIIaはファクターIX、ファクターVIII又はVon Willebrandファクターが不足している重症の個体の治療のために使用す

ることができる。

【0028】ファクターIXの生物学的活性はイントリンシク経路による血液凝固の仲介により特徴付けられる。ファクターIXはファクターXIaによりファクターIXaに活性化される。次に、ファクターIXaは、ファクターVIIa、リン脂質及びカルシウムイオンの存在下でファクターXをファクターXaに活性化する。次に、ファクターXaはプロスロンビンのスロンビンへの転換において機能し、フィブリンクロットの形成が開示される。

【0029】上記のように、ヒト血漿からのファクターVIIの単離は長時間を要し且つ高価な工程である。なぜならこのファクターは血液11中に約300μgの濃度で存在するに過ぎない希少蛋白質だからである。さらに、スロンビン、ファクターIX及びファクターXから分離することが困難であり、そして精製中の蛋白質分解的攻撃に対して感受性である(Kisiel及びMcMullen、前掲)。単鎖ヒトファクターVIIは均一に精製されているが(Kisiel及びMcMullen、前掲)、公表された精製方法は一般に低収量及び/又は他の凝固因子による汚染により限定される。

【0030】ファクターVII及びIXは肝臓により生産され、そしてその生合成のためにビタミンKを必要とする。ビタミンKはこれらのファクター中の特定のγ-カルボキシグルタミン酸残基の形成のために必要である。これらの異状アミノ酸残基は翻訳後の変形によって形成され、カルシウムイオンに結合し、そしてこの蛋白質とリン脂質小胞との相互作用を担当する。さらに、ファクターVII及びファクターIXはそれぞれ1個のβ-ヒドロキシアスパラギン酸残基を含有し、この残基も蛋白質が翻訳された後に形成される。しかしながら、このアミノ酸残基の役割は知られていない。

【0031】ファクターVII及びファクターIXの活性が特定のグルタミン酸残基のγ-カルボキシル化を含む翻訳後変化に依存し、そして又特定のアスパラギン酸残基のヒドロキシル化に依存するであろうという事実を仮定すれば、微生物中でのファクターVII及びIXのクローニング及び発現によって活性な生成物を製造することはできそうにない。

【0032】従ってこの発明は、安定にトランスフェクトされた哺乳類細胞を用いてファクターVIIaにより仲介される血液凝固のための生物学的活性を有する蛋白質を製造する方法を提供する。さらに、この発明はまた、ファクターIXにより仲介される血液凝固のための生物学的活性を有する蛋白質を製造する方法を提供する。前記のごとく、ファクターVII及びIXはその生合成のためにビタミンKを必要とする。さらに、血漿蛋白質であるプロスロンビン、ファクターX、プロテインC、及びプロテインSもそれらの生合成のためにビタミンKを必要とする。γ-カルボキシグルタミン酸残基を含有するこれらの蛋白質のアミノ末端部分は、アミノ酸配列及び生物

学的機能の両者において類似している(図8を参照のこと)。さらに、ファクターVII、プロスロンビン、ファクターIX、ファクターX、及びプロテインCのカルボキシ末端部分はそれらの特異的なセリンプロテアーゼ機能を決定する。

【0033】ファクターVIIは微量血漿蛋白質であり、そしてファクターVIIをコードするmRNAは希少であると信じられる。従って、広範囲の配列分析及び特徴付けを可能にするのに十分な量で血漿からファクターVIIを精製することは困難なままである。プロテアーゼ阻害剤の存在下においてさえ精製中にファクターVIIが分解されることがKisiel及びMcMullen(前掲)により観察された。これらの困難性のため、ファクターVIIは血液凝固系の他の一層豊富な成分に比べて十分に特徴付けられていない。事実、Kisiel及びMcMullen(前掲)の研究はファクターVIIの各鎖のわずか10残基について配列情報をもたらし、そして各配列において2つの残基の同定は仮定的であった。ウシーファクターVIIについての部分的アミノ酸配列データも公表されている(DiScipio等、前掲)。

【0034】ファクターVII mRNAの予想される希少さがファクターVII遺伝子の知識の欠如に寄与していた。常用のcDNAクローニング技法の成功は鋳型として使用するための十分な量のmRNAに依存する。逆転写の早すぎる停止は5'末端を欠くcDNAクローンの形成をもたらす、そしてこの状態は低いmRNAレベルによって悪化する。豊富でないメッセンジャーRNAのcDNAクローニングのための幾つかの方策が開発されている(Maniatis等、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、コールドスプリングハーバーラボラトリー、1982)が、しかしながら注目の生成物のアミノ酸配列についての知識の欠如がDNA配列を予想しそして適当なオリゴヌクレオチドプローブを設計することを困難にしている。これらの改良された方法を用いて僅少な蛋白質をコードする遺伝子の部分的cDNAクローンを得ることは比較的簡単であるが、ファクターVIIのごとき僅少な蛋白質をコードする遺伝子の十分な長さのcDNAクローンを得ることは依然として困難である。

【0035】ファクターVIIに比べて、ファクターIXは比較的豊富な蛋白質であり、そしてヒトファクターIX遺伝子のcDNAクローンの配列は知られている(Kurachi及びDavie, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 6461-6464, 1982; 及びAnson等、EMBo J., 3: 1053-1060, 1984)。ファクターIX遺伝子の構造は特徴付けられており、そしてこの蛋白質のアミノ酸配列は既知のアミノ酸配列に基づいて決定されている。ヒト及びウシのファクターIXについての幾つかの蛋白質配列データも公表されており、そして配列が分析されている(DiScipio等、前掲)。

【0036】この蛋白質のアミノ末端部分は12個のグ

ルタミン酸残基を含有し、これらは成熟蛋白質中ではγ-カルボキシグルタミン酸(Gla)残基に転換されている。ファクターIXの活性化に関与する開裂部位も同定されている(Kurachi 及びDavie、前掲)。ファクターIX cDNAクローンの5'末端における配列は、ほとんどの分泌される蛋白質中に見出されるシグナル配列に典型的なシグナル配列をコードしている(Kurachi 及びDavie、前掲)。組換えDNA法によるファクターIX遺伝子の発現は今まで報告されていない。

10 【0037】ファクターVII 遺伝子の十分な長さのcDNAクローンを得ることが困難であるため、リーダーペプチドをコードする領域を含むコード配列の5'末端を提供するために3種類の新しいアプローチを用いた。第1の方法によれば、ファクターVII のための部分的cDNAクローンをファクターIXのリーダーペプチド及び5'部分をコードする断片に連結する。このアプローチは、これら2つの分子のアミノ末端部分はそれぞれの蛋白質のカルシウム結合活性を担当しているという観察、及びファクターIXのカルシウム結合活性をファクターVI

20 I のそのために置換することができるという発見に基礎を置いている。

【0038】凝固因子の特異的セリンプロテアーゼ活性は分子のカルボキシ末端領域に存在するため、得られるポリペプチドは真正なファクターVII の生物学的活性を保持している。第2のアプローチは、部分的cDNAクローンと、ファクターVII のリーダー領域及びアミノ末端領域をコードするDNA配列とを組合わせる。この明細書に開示するファクターVII の部分的cDNA配列及びアミノ酸配列は、ファクターVII 遺伝子の5'部分を含んで成るクローンのcDNAライブラリー又はゲノム性DNAライブラリーのスクリーニングを可能にする。

30 【0039】第3のアプローチは、部分的cDNAクローンと、ファクターIXのリーダーペプチドをコードするcDNA断片及びコンセンサス(consensus)カルシウム結合部位又はファクターVII の予想されるアミノ末端配列を含んで成るハイブリッドコード配列との連結を用いる。ファクターVII のアミノ末端のためのコード配列は、この明細書に開示される今まで公表されていないアミノ酸配列データにより確立された。コンセンサス配列は、ファクターVII のデータ、及び他のビタミンK-依存性血漿蛋白質について公表されている配列データから導かれる。ファクターVII 遺伝子の5'部分を含んで成るクローンのスクリーニングについて上に記載したアプローチに従って、本発明者等は発現のために適当な十分な長さの正しいcDNAを得ることに成功した。

【0040】生じたcDNAクローンの内、"λVII 2463"と称するクローンが最も長いファクターVII cDNA挿入部を含有していた。このものはファクターVI

50 I の完全なコード配列を含有していることが見出された。このクローンは35ヌクレオチドの5'非翻訳領

域、60アミノ酸のリーダーをコードする180ヌクレオチド、406アミノ酸の成熟蛋白質をコードする1218ヌクレオチド、終止コドン、1026ヌクレオチドの3'非翻訳配列、及び20塩基のポリ(A)テイル(2463位から始まる)を含有していた。このcDNAは両鎖について完全に配列決定された。これと、クローンλVII 2115及びλVIII 923から初期に単離されたcDNA挿入部との比較により、λVII 2463は1個のEcoRI断片上に、ファクターVII リーダー及び成熟蛋白質配列をコードするファクターVII cDNAを含有することが明らかになった。

【0041】第2のクローンλVII 565を単離した。このクローンは、ヌクレオチド100-165(図4)が欠けている点を除きクローンλVII 2463のヌクレオチド9からヌクレオチド638までのcDNAと同じcDNA挿入部を含んでいた。cDNAとファクターVII ゲノム性DNAとの比較において、存在しない配列は1個のエクソン様領域に正確に対応した。従って、択一的mRNAスプライシング現象を反映した2個のファクターVII cDNAが得られた。

【0042】λVII 2463によりコードされるリーダーは非常に長く(60アミノ酸)、そしてファクターIX、プロテインC及びプロスロンビンと比較した場合、非常に異なる疎水性プロフィールを有する。このリーダーは-60位及び-26位に2個のメチオニンを含有する。翻訳開始は-60位から始まると考えられる。なぜなら、シグナルペプチドに特徴的な疎水性領域は-26位に続くのではなく-60位に続くからである。ゲノムクローン中のエクソン様領域に正確に対応する、λVII 565中に存在しない配列はファクターIX、プロテインC及びプロスロンビンに一層類似する疎水性パターンを有する38アミノ酸のリーダーをもたらすことは興味深いことである。

【0043】前記のリーダーのいずれが(もしくはれかだとすれば)真正であるか明らかでないため、追加のアプローチにおいて5'末端配列を分析する様に努力した。要約すれば、このアプローチは、ヒトゲノムDNAライブラリーの造成及びスクリーニング、並びにファクターVII 遺伝子配列を含んで成るゲノムクローンの同定を含む。次に、ゲノム配列の5'領域をcDNAに連結して十分な長さのクローンを造成した。

【0044】追加の造成において、リーダーのすべて及び成熟コード配列の29アミノ酸を含有するλVII 565の5'ファクターVII cDNA断片を、λVII 2463のcDNAの断片(成熟蛋白質の残部及び3'非翻訳配列を含有する)に連結した。この“565-2463”配列は十分な長さのファクターVII cDNA配列を単一EcoRI断片として含有する。

【0045】次に、上記のDNA配列を適当な発現ベクターに挿入し、今度はこのベクターを用いて哺乳類セル

ラインをトランスフェクトした。この発明の実施において使用するための発現ベクターはトランスフェクトされた哺乳類細胞中で外来性遺伝子の転写を指令することができるプロモーターを含んで成るであろう。ウイルス性プロモーターが、転写を指令するそれらの効率のために好ましい。特に好ましいこのようなプロモーターはアデノウイルス2からの主要後期(major late)プロモーターである。

【0046】このような発現ベクターはさらに、プロモーターから下流であり、且つ血液凝固のための生物学的活性を有する蛋白質をコードする遺伝子の挿入部位から上流に位置する1組の複数のRNAスプライス部位を含有するであろう。好ましいRNAスプライス部位配列はアデノウイルス及び/又は免疫グロブリン遺伝子から得られるであろう。さらに、発現ベクター中には前記挿入部位の下流に位置するポリアデニレーションシグナルを含有する。

【0047】ウイルス性ポリアデニレーションシグナル、例えばSV40からの初期もしくは後期ポリアデニレーションシグナル、又はアデノウイルス5:E1b領域からのポリアデニレーションシグナルが好ましい。特定の好ましい態様においては、発現ベクターはさらに、プロモーターとRNAスプライス部位との間に位置するウイルスリーダー配列、例えばアデノウイルス2トリバルタイトリーダーを含有する。好ましいベクターはさらに、エンハンサー配列、例えばSV40エンハンサーを含有することができる。

【0048】次に、クローン化されたDNA配列を、リン酸カルシウム介在トランスフェクションにより、培養された哺乳動物細胞に導入する。(Wigler等、Cell, 14:725, 1978; Corsaro 及び Pearson, Somatic Cell Genetics, 7:603, 1981; Graham 及び Van der Eb, Virology, 52, 456, 1973.) DNA及びリン酸カルシウムの沈澱を生成せしめ、そしてこの沈澱を細胞に適用する。細胞の一部がDNAを取り込み、そしてそれを数日間細胞内に保持する。細胞の小画分(典型的には10⁻⁴)がDNAをゲノムに安定に取り込む。これらの安定な取り込みを同定するため、一般に、選択可能な表現型(選択マーカー)を付与する遺伝子を目的遺伝子と共に導入する。好ましい選択マーカーには薬剤例えばG-418及びメトトレキサートに対する耐性を付与する遺伝子が含まれる。

【0049】選択マーカーは目的遺伝子と同時に別個のプラスミドにより細胞に導入してもよく、又はこれらと同じプラスミドにより導入してもよい。好ましい選択マーカーは薬剤G-418に対する耐性の遺伝子であり、これはプラスミドpKOneo上に担持されている(Southern 及び Berg, J. Mol. Appl. Genet., 1:327-341, 1982)。細胞に導入される混合物に“キャリアDNA”として知られている追加のDNAを添加すること

も有利である。細胞がDNAを取り込んだ後、これらを一定期間、典型的には1〜2日間増殖せしめて、目的遺伝子の発現を開始する。次に薬剤選択を適用して選択マーカーが安定に発現している細胞の増殖について選択する。これらの細胞のクローンを、目的蛋白質の発現についてスクリーニングする。

【0050】形質転換された細胞により生産されたファクターVII及びファクターIXは、クエン酸バリウムへの吸着により細胞培養培地から取り出す。スベント培地をクエン酸ナトリウム及び塩化バリウムと混合し、そして沈澱を集める。次に、沈澱した材料を該当する凝固因子の存在について測定する。免疫吸着によりさらに精製することができる。免疫吸着カラムは高特異性モノクローナル抗体を含んで成るのが好ましい。別の方法として、クエン酸バリウムにより沈澱した材料の精製は、一層一般に使用されている生化学的方法により、又は高速液体クロマトグラフィーにより行うことができる。

【0051】単鎖ファクターVIIの活性な2本鎖ファクターVIIaへの転換は、Hedner及びKisiel (J. Clin. Invest., 71: 1836-1841, 1983)により記載されているようにファクターXIIaを使用して、又はトリプシン様特異性を有する他のプロテアーゼ (Kisiel及びFujikawa, Behring Inst. Mitt., 73: 29-42, 1983)により達成することができる。

【0052】要約すれば、この発明は形質転換された哺乳動物細胞を用いてビタミンK依存性血液凝固因子の活性を有する蛋白質を製造する方法を提供する。凝固因子の特定のセリンプロテアーゼドメインをコードする遺伝子配列はcDNAライブラリーから単離される。リーダー配列及びカルシウム結合ドメインをコードする配列はcDNAもしくはゲノムライブラリーから単離され、又は合成されたオリゴヌクレオチドから造成される。次に、これらの配列を適当な発現ベクター中で連結して、血液凝固のための所望の生物学的活性を有する蛋白質をコードするようにする。得られるベクター、及び薬剤耐性マーカーを含有するプラスミドを適切な哺乳類組織培養細胞に同時トランスフェクトする。次に、トランスフェクトされた細胞を適当な薬剤、例えばG-418を添加することにより選択する。次に、蛋白質生成物を血液凝固アッセイにおける生物学的活性について測定し、また真正なヒト凝固因子に対して調製された抗体を用いて免疫学的交差反応性について測定する。

【0053】次に記載する例を要約すれば、例1はファクターVIIの十分な長さのcDNA配列のクローニングを開示する。例2は、アミノ酸末端の約30個のアミノ酸を含む、ヒトファクターVIIの部分アミノ酸配列を開示する。例3はヒトゲノムDNAライブラリーの造成及びスクリーニング、並びにファクターVII遺伝子配列を含んで成るゲノムクローンの同定を開示する。例4は、ファクターIXのリーダーペプチドをコードするcD

NA断片及びコンセンサスカルシウム結合ドメインをコードする合成2本鎖断片をそれぞれが含有する2種類のハイブリッドセグメントの造成を開示する。次に、ハイブリッド配列をファクターVIIの部分cDNAクローンに連結する。

【0054】次に、インービトロ変異の誘発を用いて、コンセンサス配列をファクターVIIの蛋白質配列データに一致するように変形した。例5は、ファクターIXのカルシウム結合ドメイン及びファクターVIIの特異的セリンプロテアーゼドメインを含んで成る融合蛋白質をコードする遺伝子配列の造成を記載する。図13は、トランスフェクトされた哺乳類細胞中で血液凝固のための生物学的活性を有する蛋白質を発現するのに使用するベクターpD2の造成を記載する。例2に記載する遺伝子融合体はこのベクターを用いて発現される。例7は、形質転換された哺乳類細胞系中でファクターIXの遺伝子が発現するためのベクターpD2の使用を記載する。

【0055】例8は、ファクターVIIに融合したファクターIXのリーダー配列を含んで成る一次翻訳生成物をコードするDNA配列を含有するベクターpM7135の造成を記載する。このベクターはトランスフェクトされた哺乳類細胞系においてファクターVIIの活性を有する蛋白質を生産するために使用することができる。例9はcDNA配列を使用するファクターVIIの発現、及びゲノムDNA-cDNAハイブリッド配列からのファクターVIIの発現を記載する。

【0056】

【実施例】次に例によりこの発明をさらに具体的に説明するが、これによりこの発明の範囲を限定するものではない。制限酵素はベセスダ・リサーチ・ラボラトリーズ (Bethesda Research Laboratories; BRL)、及びニュー・イングランド・バイオラプス (New England Biolabs) から入手し、そして特にことわらない限り製造者の指示に従って使用した。オリゴヌクレオチドはアプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) モデル380A DNA合成機により合成し、そして変性ゲル上でのポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製した。E. コリ (E. coli) の形質転換はManiatis等 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー、1982)により記載された方法により行った。M13及びpUCクローニングベクター、並びに宿主株はBRLから入手した。ファクターVIIはKisiel及びMcMullen (前掲)により記載された方法によりヒト血漿から調製した。

【0057】例1. 部分的ファクターVII cDNAのクローニング

A. ヒト肝臓cDNAライブラリーの造成
Candra等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 1845-1848, 1983の方法により、ヒト肝臓mRNAからcDNAライブラリーを調製した。cDNA調製物をアルカリ性

シュークロースグラジエント (Monahan 等, Biochemistry, 15: 223-233, 1976) により沈降せしめ、そして約1000ヌクレオチド以上のポリヌクレオチドを含有する画分をプールした。

【0058】第一鎖調製物を逆転写酵素を用いて2本鎖にし (Chandra 等, 1983) S1ヌクレアーゼで処理し、そして残留する接着末端を4種類すべてのデオキシリボヌクレオチドトリホスフェートの存在下でDNAポリメラーゼI (Klenow断片) を用いてフィラーインした (Maniatis等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー, 1982)。平滑末端化されたcDNAをEcoRIメチラーゼで処理し、そしてT₄ DNAリガーゼを用いてリン酸化されたEcoRIリンカーに連結した (Maniatis等, 前掲)。連結されたDNA調製物をEcoRIにより十分に消化して過剰のリンカー配列を除去しそして約1000塩基対より長い2本鎖DNAを中性シュークロースグラジエント遠心により精製した (Maniatis等, 前掲)。天然λgt11 DNAコンカテマー (concatemer) に連結し、そしてEcoRIにより完全消化し、そして5'末端のリン酸を細菌性アルカリ性ホスファターゼ処理により除去した。

【0059】プールされたヒト肝臓cDNAをファージDNAに連結し、インービトロでパッケージし (Maniatis等, 前掲)、そしてこれを用いてE. コリY1088に感染させた (Young 及び Davis, Science, 222: 778-782, 1983)。このライブラリーにおいて約14×10⁶個の一次ファージブランクが生じた。これは約2×10⁶個ずつの7つのライブラリーから成る。これらの90%以上がヒトDNA挿入部を含有する組換体であった。この結論はβ-ガラクトシダーゼ活性の欠失、並びにEcoRIによる20個の無作動クロンの消化及びこれに続くアガロースゲル電気泳動による特徴付けによるものである。ファージ粒子の形のcDNAライブラリーを塩化セシウムグラジエント遠心分離により精製し、そしてSM緩衝液 (Maniatis等, 前掲) 中に貯蔵した。

【0060】B. ヒト肝臓cDNAライブラリーのファクターVII クローンについてのスクリーニング
前記のヒト肝臓発現cDNAライブラリーを、精製されたファクターVII を用いてBrown 等 (J. Biol. Chem., 225: 4980-4983, 1980) の方法により調製した、¹²⁵I-ラベルされたモノクローナルファクターVII 抗体を用いて特異的抗原についてスクリーニングした (Young 及び Davis, 前掲)。6×10⁶個のファージブランクのスクリーニングにより、抗体に対して陽性反応を与える1個の単離体が同定された。これをλVII 2115と称する。

【0061】このファージクローンλVII 2112を、他の2種類の抗-ファクターVII モノクローナル抗体、

及びファクターVII に対するラビットポリクローナル抗体に対して試験した。単離体λVII 2115はこれらすべての抗-ファクターVII 抗体に対して陽性反応を示した。λVII 2115のプレート溶菌物 (lysate) (Maniatis等, 65-66頁, 1982) からDNAを調製した。このDNAをEcoRIで消化することにより2139塩基対の挿入部が遊離した。この挿入部をM13ファージベクター (Messing, Meth. in Enzymology, 101, 20-77, 1983; 及びNorrander 等, Gene: 101-106, 1983) にサブクローニングしてチエインターミネーションジデオキシDNA配列決定 (Sanger等, Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 5463-5467, 1977) を行った。このcDNA挿入部は214位、839位、及び1205位にPstI部位を含有し (これらを図1~図2) において、それぞれPstIa, PstIb及びPstIcと称する)、そして611位に位置するSmaI部位を含有する。次のM13鋳型を配列決定した。

【0062】1) 全長 (2139塩基) EcoRIa→EcoRIb断片, M13mp18中 (クローンF7-1と称する);

2) PstIa→EcoRIa 214塩基断片, M13mp19中 (F7-2);

3) PstIa→PstIb 625塩基断片, M13mp18中 (F7-3);

4) PstIb→PstIa 625塩基断片, M13mp18中 (F7-7);

【0063】5) SmaI→PstIb 228塩基断片, M13mp10中 (F7-8);

6) PstIb→PstIc 366塩基断片, M13mp18中 (F7-9);

7) PstIc→PstIb 366塩基断片, M13mp18中 (F7-10);

8) PstIc→EcoRIb 930塩基断片, M13mp19中 (F7-11); 及び

9) EcoRIb→EcoRIa 全長断片, M13mp18中 (F7-12)。

【0064】(制限部位の名称は図1~図3に関する。)

このデータは両鎖上の配列において91%のコード領域及び15%の3'非翻訳領域を確認し、そして残りのコード領域の9%及び非コード領域の85%について単鎖配列情報をもたらした。cDNA配列から予想されるアミノ酸配列と、Kisiel及びMcMullen (Thrombosis Research, 22: 375, 1981) の既知のアミノ酸配列データ及び下記 (例2) のアミノ酸配列との比較により、DNA配列中400位の近傍の3個のヌクレオチドの不存在により説明することができる異状が示された。追加の配列データを得るため、λVII 2115をEcoRIで消化し、そしてファクターVII コード断片を、EcoRIにより消化されたpUC13 (Vieira及び Messing, Gen

e, 19, 259-268, 1982 ;及びMessing、前掲)に挿入した。

【0065】pUCVII 2115と称する得られる組換えプラスミドを、328位で切断するXbaIで消化した。消化されたサンプルを半分ずつに分け、半分を α^{32} P dCTP及びDNAポリメラーゼI (Klenow断片)によりラベルし(Englund, P.T. J.Mol.Bio., 66, 209, 1972)、他方の半分を γ^{32} P ATP及びポリヌクレオチドキナーゼによりラベルした(Chaconas等、Biochem.Biophys.Res.Comm., 66: 962: 1975)。次に、ラベルされたプラスミドをPstIにより再切断して113塩基対及び509塩基対の断片を得た。

【0066】これらのそれぞれの断片の両鎖をMaxam及びGilbert (Meth. in Enzymology, 74: 560, 1980)の方法により配列決定した。113塩基対はその全体にわたって配列決定し、そして509塩基対断片中の210塩基対を配列決定した。これらの配列はDNA配列データを蛋白質配列データと一致させる追加の3個の塩基(1個のC及び2個のG)を示し、前記の異状な結果はG及びCを含む二次構造に基く配列決定ゲル上での圧縮により生じたことが示された。両鎖上のコード領域の最後の9%の配列も確認された。

【0067】pUCVII 2115の配列をさらに分析することにより、このクローン化断片がファクターVIIの開裂部位にあることが知られている11アミノ酸の配列をコードしていることが確認された(Kisiel及びMcMullen, Thrombosis Research, 22: 375, 1981)。この配列とファクターIX (Davie等、前掲)及びファクターX (Leytus等、Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 81: 3699-3702, 1984)アミノ酸配列との比較により、このクローンは成熟ファクターVII蛋白質のアミノ酸36をコードするヌクレオチド(およそ)から始まりおよそ1000のコードヌクレオチド及び1100の非コードヌクレオチド並びにポリA配列まで続くファクターVIIの配列を含むことが示唆された。さらに、このクローンは3'コード配列にフレームシフト変異を有していた。

【0068】正しい3'コード領域を得るため、7つの λ gt11 cDNAライブラリーの1.4 \times 10⁶個のクローンのすべてをブラックハイブリダイゼーションにより(Benton及びDavid, Science, 196: 180-181, 1977)、 λ VII 2115のニックートランスレートされたcDNAを用いてスクリーニングした(Maniatis等、109-112頁、1982)。

【0069】次に、7個の陽性単離体を、cDNA挿入部がサブクローニングされたpUCプラスミドのジデオキシ配列決定法によりスクリーニングした(Wallace等、Gene, 16, 21, 1981)。 λ gt11クローンをEcoRIで消化し、そしてファクターVII断片を、EcoRIで開裂されたpUC13に挿入した。これらの1つを除くすべてが λ VII 2115中の挿入部の塩基212に

対応する位置から出発し、1個の例外は3'非コード領域のみから成ることが見出された。塩基212から始まるクローンの1つを分析のために選択し、クローンpUCVII 1923と命名した。

【0070】pUCVII 2115の分析により657位と815位の間にフレームシフト変異が存在することが示されたため、pUCVII 1923をまずこの領域においてMaxam-Gilbert配列決定法により分析した。プラスミドpUCVII 1923をNarI (図2中779位)により消化した。切断されたDNAをDNAポリメラーゼI (Klenow断片)を用いて α^{32} P dCTPによりラベルし、そして次にAvaI (これは図1中SmaIと同じ部位を開裂せしめる)及びTaqI (1059部位)により消化してNarI-AvaI 166bp断片、及び200bpNarI-TaqI断片を得た。これらのそれぞれを配列決定した。pUCVII 2115中で欠けているCは697位に見出され、そしてやはりpUCVII 2115中で欠けている他方のCは798位に見出された。

【0071】pUCVII 1923のコード領域の配列の残りの部分が正しいことが、pUCVII 1923の全挿入部のM13サブクローン上でのジデオキシ法による配列決定によって示された。LacプライマーZC87 (表1)を用いて212位(図1)から512位までの配列を決定し、プライマーZC218 (CTCTGCTGCCGAA C)を用いて715位から1140位までの配列を決定し、そしてプライマーZC217 (ATGAGAAGCGCACGAAG)を用いて720位から350位までを配列決定した。pUCVII 2115挿入部は13位から695位まで正しく(1~12位は人工的リンカーを含む)、そしてpUCVII 1923は212位から最後まで正しいので、この2者を継ぎ合わせて13位(図1)から最後まで正しい分子を得た。この継ぎ合わせのために用いられる便利な点は328位のXbaI部位である。継ぎ合わされた正しい分子を図1に示す。

【0072】十分な長さのファクターVIIクローンをcDNAクローニングによって得ることは困難であったから、欠けているコード配列、並びに必要なプロセッシング及びシグナル配列を得るために3つの方策を採用した。第1の方策はヒトゲノムDNAライブラリーから、又はcDNAライブラリーの追加のスクリーニングにより必要な配列を得ることであった。第2のアプローチは、ファクターVIIのアミノ酸配列データ(例2)及びビタミンK-依存性凝固因子の公表されている配列(Kurachi及びDavie、前掲;及びDavie等、前掲)に基いて必要な5'コード配列を合成し、そしてこれをファクターIXのプレプロ配列の部分に連結することであった。第3の方策はファクターVIIとファクターIXのアミノ末端の機能的類似性に基く。ファクターIXのリーダー及びアミノ末端部分のコード領域を含んで成る配列を造成した。次

21

にこれを部分的ファクターVII cDNAに適切な方向に融合せしめた。

【0073】ファクターVII の完全DNA配列を含んで成るDNA配列を得るため、残りの5' DNA配列を単離することを試みた。これは、λVII 2115のcDNA挿入部からの5' 末端0.3kb EcoRI-XbaI断片を用いて2×10⁶ フェージから成るcDNAライブラリーをスクリーニングすることによって行った。Gubler及び Hoffman (Gene 25:263-269, 1983)の方法を適用してHe pG2細胞からのポリ(A)mRNAを用いてライブラリーを造成した。RNAを逆転写して第1鎖cDNAを生成せしめ、次にDNAポリメラーゼI及びRNAアゼHを用いて第2鎖の合成を行った。

【0074】EcoRIメチル化及びセファロース6Bカラムの通過の後、T₄ DNAポリメラーゼを用いてDNA末端を平滑化した。EcoRIリンカーを付加し、そして過剰のリンカーをEcoRIによる消化及びセファロースCL2B上でのクロマトグラフィーにより除去した。ポイドポリウム中のDNAを集め、そしてEcoRIで消化されそしてウシ腸ホスファターゼで処理されたλgt11に連結した。このDNAをパッケージし、そしてE. コリY1088中に感染させた。幾つかの陽性クローンが観察され、そして次にEcoRI断片をM13ファージベクターにサブクローニングし、そしてM13ユニバーサルプライマー又はファクターVII 特異的オリゴヌクレオチドを用いてジデオキシ配列決定を行った。

【0075】これらからファクターVII のcDNAクローン3個を得、そしてこれらの配列を完全に決定した。λVII 2463と称するクローンからの、これらのcDNAの内最長のものはファクターVII の完全なコード配列を含有することが見出された。このクローンは、35ヌクレオチドの5' 非翻訳領域、60アミノ酸のリーダーをコードする180ヌクレオチド、406アミノ酸の成熟蛋白質をコードする1218ヌクレオチド、終止コドン、3' 非翻訳領域の1026ヌクレオチド、及び20塩基のポリ(A)テイル(2463位から始まる)を含有していた。このcDNAを両鎖について完全に配列決定した。

【0076】これと、クローンλVII 2115及びλVI 1923から前に単離した2つのcDNAとの比較により、クローンλVII 2463はλVII 2115中の挿入部の上流に追加の321個のヌクレオチドを含有し、そしてλVII 1923中の挿入部の上流に519ヌクレオチドを含有することが示された。λVII 2463 cDNA及びこれら2つのcDNAのファクターVII 配列のオーバーラップが認められた。但し、λVII 2463のcDNAは、λVII 2115のcDNA中に検出される1005位及び1106位における単一塩基欠落を含まない。従って、λVII 2463は単一のEcoRI断片

22

上にファクターVII リーダー及び成熟蛋白質配列をコードするファクターVII cDNAを含有する。

【0077】追加のcDNAすなわちλVII 565を単離した。そしてこれは5' 末端ファクターVII 配列を含有するが、しかしコード配列内で切断されていることが観察された。その5' 末端はヌクレオチド9に位置する(図4)。十分な長さのλVII 2463と比較した場合、λVII 565はリーダー配列内の1つのエクソン様領域に対応する配列を欠くことが見出された。塩基100-165がλVII 565には存在しない(図4)。この存在しない配列は、ゲノム配列データ(例3中に記載されている)との比較により、1つのエクソン様領域に正確に対応する。従って、λVII 565はリーダー配列中での択一的なスプライシングが現象の結果であろう。

【0078】λVII 2463によりコードされるリーダーは非常に長く(60アミノ酸)、そしてファクターIX、プロテインC及びアロスコロンビンと比較した場合非常に異なる疎水性プロフィールを有する。このリーダーは-60位及び-26位に2個のMetを含有する。シグナルペプチドに典型質な疎水性領域は-26位のMetではなく-60位のMetに続くので、第1のMetから開始されるようである。ゲノムクローン中のエクソン様領域に正確に対応する、λVII 565中の不存在領域が上記の蛋白質に一層類似した疎水性パターンを有する38アミノ酸リーダーをもたらすことは興味あることである。

【0079】例2. ヒトファクターVII のアミノ酸配列

仮定的なcDNAクローンの同定を確認し、ファクターVII cDNAの配列を実証し、5' 配列を含有するクローンについてcDNAライブラリー及びゲノムライブラリーをスクリーニングするための特異的オリゴヌクレオチドプローブの合成を可能にする情報を得、そしてファクターVII のアミノ末端部分をコードする合成断片を造成するために、ヒトファクターVII のアミノ酸配列を解明することが望ましい。Kisiel及びMcMullen(前掲)により限られたアミノ酸配列が与えられたが、より多くの情報が必要であった。

【0080】精製されたヒトファクター VIIa (Kisiel及びMcMullen, 前掲)を還元し、そしてCrestfield等、J.Biol.Chem., 238, 622, 1963の方法によりカルボキシメチル化した。カルボキシメチル化されたファクター VIIaのライトポリペプチド鎖及びヘビーポリペプチド鎖を、マイクロバックC18逆相カラム(バリアン社)上で高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により分離した。この場合、蒸留水中0.1%TFA(A)、及びアセトニトリル中0.1%TFA(B)を用いて、5分間に0~40%のB、25分間に40~80%のB、及び5分間に80~100%のBから成るグラジエントにより溶出した。

【0081】約300pmoleの各ペプチド鎖を、ガス-フェーズ・プロテイン・シーケンサー（アプライド・バイオシステムズ社）を用いて自動化されたエドマン分解により分析した。ヘビーポリペプチド鎖及びライトポリペプチド鎖のアミノ末端において、それぞれ18残基及び29残基が同定された。ファクター VIIaのヘビー鎖のアミノ末端配列はcDNAクローンpUCVII 2115により推定されるそれ（図9）と一致した。アミノ酸配列は図8及び図9中で1文字コードにより次のように示される。

【0082】

A	アラニン
C	システイン
D	アスパラギン酸
E	グルタミン酸
F	フェニルアラニン
G	グリシン
H	ヒスチジン
I	イソロイシン
K	リジン
L	ロイシン
M	メチオニン
N	アスパラギン
P	プロリン
Q	グルタミン
R	アルギニン
S	セリン
T	スレオニン
V	バリン
W	トリプトファン
Y	チロシン
X	未知残基

【0083】また、*は、既知の凝固因子の構造との類似性及びこれらの位置における他のフェニルチオヒダントイン-アミノ酸の不存在により、G1a残基（*）が割合てられた。配列間の最良の整列を与えるためにギャップ（-）が置かれている。さらに、この情製は、5位及び9位のアミノ酸がリジンであって、すでに報告されている（Kisiel及びMcMullen、前掲）ように、それぞれスレオニン及びアルギニンではないことを示した。ファクターVIIのアミノ末端領域に由来するファクター VIIaのライト鎖の配列分析はcDNAクローンpUCVII 2115の5'末端によりコードされた構造とオーバーラップするのに約6残基不足していた。

【0084】追加の配列データを得るため、2nmoleのカルボキシメチル化されたライト鎖を0.1M炭酸水素アンモニウム中pH7.8、37℃にて12時間、ウシキモトリプシン（1:100w/w、酵素:基質）により消化した。生じた断片をマイクロバックC18逆相カラム上でのHPLCにより精製した。前記の溶剤を用い、

5分間で0~30%のB、25分間で30~60%のB、及び10分間で60~80%のBから成るグラジエントにより溶出した。

【0085】ポリペプチドを、その220nm及び280nmにおけるUV吸収により同定した。凍結乾燥されたペプチド（約1nmole ずつ）をエドマン分解により分析した。その結果（図9）は、クローンpUCVII 2115の対応領域中のcDNA配列の多くを確認した。ファクター VIIaのライト鎖ペプチドの152残基中合計11残基（7.5%）が同定された。この配列は知られているcDNA構造によりコードされるそれと同一である。間接的証明により、Asn145が炭水化物付加部位であるとが示される。

【0086】例3. ゲノム性ファクターVII 配列のクローニング

cDNAに欠けている5'末端配列を得るための1つのアプローチとして、ヒト胎児肝臓DNAを含む入ファージライブラリー（Lawn等、Cell, 15:1157-1174）を、ニックトランスレートされたファクターVII cDNAによりスクリーニングした。ゲノムライブラリーの一部をE. coli LE392 (ATCC 33572) 上にプレートして合計7.2×10⁶個のプラークを生じさせた（Maniatis等、前掲、320-321頁）。ファージプラークをプレートからニトロセルロース上に吸着せしめ、そしてBenton及びDavis (Science, 196:180, 1977)の方法に従って、³²P-ラベルされたcDNAとハイブリダイズせしめた。8個のクローンを得、そしてプラークを精製した。

【0087】ファクターVII cDNA (λVII 2115)の5'末端からのDNA断片（EcoRIa-XbaI、図1）及び標準的方法（Maniatis等、前掲）を用いて、5'末端配列を含有するゲノムクローンを同定した。これらのファージを7m1、7m2、及び7m3と命名した。これらの組換え体ファージからDNAを調製し、そして予備的なエンドヌクレアーゼ地図を得た。最も強いハイブリダイゼーションシグナルを与えるファージ7m1を用いて一層広範囲制限地図を作成し、そしてEcoRI-XbaI cDNA断片をサザンブロットィング（Southern, J. Mol. Biol., 98:503, 1975）によりこの地図上においた。

【0088】ファージ7m1がファクターVII 蛋白質のアミノ末端アミノ酸をコードするDNA配列を含有するか否かを決定するため、ファージDNA制限消化物のサザンブロットを、その配列がファクターVII アミノ末端アミノ酸配列から推定されたオリゴヌクレオチドの混合物とハイブリダイズせしめた。オリゴヌクレオチドZC188、ZC360、及びZC401（表1及び表2）をT₄ポリヌクレオチドキナーゼを用いて放射性ラベルし、そしてそれらのT₄以下で数℃においてファージDNAブロットにハイブリダイズせしめた（Wallace, R.

25

26

B. 等、Nuc.Acids.Res., 6:3543-3557, 1979)。

* られた結果により、アミノ末端蛋白質配列データに対応するおよそ60ヌクレオチドの長さの領域が同定された。

【0089】この分析の結果により、7m1の3.7kbのSst I断片がこれらのオリゴヌクレオチドとハイブリダイズする配列を含むことが示された。このSst I断片をDNA配列分析のためM13にサブクローン化した。配列決定用プライマーとしてZC360を用いて得*

【0090】

【表1】

オリゴヌクレオチド	配列
ZC87	TCC CAG TCA CGA CGT
ZC188	GCC GGG ^T _C CTC ^A _A CTC CTC CA ^A _G GAA GGC GTTGC
ZC212	GAC CTG CAG GAT CCA TGC AGC GCG TGA ACA TGA TCA TGG
ZC213	GAG GCC TGG TGA TTC TGC CAT GAT CAT GTT CAC GCG CTG
ZC217	ATC AGA AGC GCA CGA AG
ZC218	CTC TGC CTG CCG AAC
ZC235	GAT CCA TGC AGC GC
ZC249	AGA ACA GCT TTG TTC TTT CA
ZC275	GCC CCC ATT CTG GCA

【0091】

※ ※【表2】

ZC285	CCA AAG AGG GCC AAC GCC TTC CTG GAG GAG AGA CCT GGG AGC CTG GAG AGA GAG TGT ATT GAG G
ZC287	AAT ACA CTC TCT CTC CAG GCT CCC AGG TCT CTC CTC CAG GAA GGC GTT GGC CCT CTT TGG
ZC288	AGC AGT GTA GCT TCG AGG AGA ACA GAG AGG TTT TCG AGG CCA GCG ACG
ZC289	AAT TCG TCG CTG GCC TCG AAA ACC TCT CTG TTC TCC TCG AAG CTA CAC TGC TCC
ZC333	CAG CTT CGT CCT GTC GCT GGC CTC
ZC336	CCT CTT TGG GCC TGG TGA
ZC360	CA ^C _T TC ^C _T TC ^C _T TC ^C _T TT ^G _A CA
ZC401	CGT AGC GTT CAG GCC CTC GAA GAT CTC GCG GGC CTC CTC GAA GCT ACA C

【0092】ゲノムクローン7m1はエクソン2の上流の7kb配列を含有することが知られたため、このクローンはファクターVII 5' 非翻訳配列及び-17位のアミノ酸までのリーダー配列を含有するものと予想された。ゲノムクローン7m1内にエクソン1がコードされてい★

★ることを確認するため、クローンλVII 2463及びλVII 565からのリーダー配列情報を用いて下に示すオリゴヌクレオチドZC528及びZC529を設計した。

【0093】

ZC528 5' TCA ACA GGC AGG GGC AGC ACT GCA GAG ATT 3'

ZC529 5' TTC CAC GGC ATG TCC CGT GTT TCT CCT CCT 3'

これらを用いて7m1 DNAをプローブし、そしてサ☆50☆ブクローン7SDが両オリゴヌクレオチドとハイブリダ

イズすることが見出された。エクソン1は2個のエクソン性配列、すなわちZC528 (λVII 2463中ヌクレオチド1〜30に対応する) にハイブリダイズするエクソン1a、及びZC528 (λVII 2463中ヌクレオチド119〜148に対応する) にハイブリダイズするエクソン1bから成ることが決定された。

【0094】エクソン1a及びエクソン1bの両者を挟むイントロン配列が配列決定された。1aは該エクソンの3'末端にコンセンサスプライスドナー配列を含み、そして1bは各末端においてコンセンサスプライスアクセプター (1bの上流) 又はドナー (1bの下流) 配列を含有する。ゲノムクローン7m1内のエクソン1aの位置は正確にマップされたが、エクソン1bのそれは定義された領域内にマップされた。エクソン1b配列はλVII 2463中に存在し、他方λVII 565は*

ファクターVII遺伝子中のイントロ/エクソン連結部位

* 1bエクソン配列をルーピングアウトしてエクソン1aとエクソン2との間でスプライスされたRNAに由来するようである。

【0095】pUC及びM13ベクター中の種々の7m1サブクローンを調製して残りのエクソンの配列決定を促進した。エクソン1〜7に対応する、cDNA配列から設計された適当なオリゴヌクレオチドを用いて最終エクソン以外のすべてを配列決定した。ゲノム配列はこれらの領域にわたるcDNA配列に正確に対応する。さらに、エクソン1〜7のイントロン/エクソン境界が決定され、そしてほとんどがクローン7m1内に正確に配置される。ファクターVII 遺伝子内のイントロンのサイズ及び位置を表3に挙げる。

【0096】

【表3】

イントロン	アミノ酸位置	イントロンサイズ(kb)
A	-39	>0.2
B	-17	>1.0
C	37/38	1.92
D	46	0.068
E	84	~2
F	131	~1
G	167/168	0.56
H	209	1.31

【0097】ファージ7m1はエクソン8を含むファクターVII 3'末端を欠くことが知られた。これらの配列を得るため、ヒト皮膚一次線維芽細胞由来のλL47.1 (Loenen及び Brammer, Gene, 10, 249, 1980; Maniatis等、前掲) 中12〜13kbが濃縮されたBamHIライブラリーを2種類のニックトランスレートされたファクターVII cDNA PstI断片 (エクソン7中の配列及び3'非翻訳配列に対応する) によりプローブした。両プローブにより7DC1と称するクローンが検出された。

【0098】これに続く制限エンドヌクレアーゼ分析及びサザンブロット分析により、クローン7DC1はクローン7m1とオーバーラップし、そしてその末端の後に約3kb伸びること、及びこのものはエクソン8を含むことが確立された。エクソン8を含有する7DC1 DNAからの3.9kb (XbaI-BamHI) 断片をM13にサブクローニングし、そしてその5'及び3'末端に相補的なオリゴヌクレオチドを用いて配列分析を行った。完全なエクソン配列がこのクローン中に存在する。

【0099】例4. 合成コード配列を含有するファクタ※50

※IX-ファクターVII ハイブリッド遺伝子

A. ハイブリッドファクターIXリーダー-合成ファクターVII 5'コード配列

ファクターVII の5'コード配列を得るための第2の方法は、ファクターVIIのアミノ末端アミノ酸配列、他のビタミンK-依存性凝固因子のアミノ酸配列、及び他のビタミンK-依存性凝固因子遺伝子 (Kurachi 及び Davie、前掲; Anson等、EMBO J., 3:1053-1060, 1984; 及び Davie等、前掲) に基いて推定されたヌクレオチド配列を用いて適当な2本鎖断片を合成することであった。成熟ファクターVII 類似体の分泌のために必要な分泌及びプロセッシングシグナルを得るため、この合成断片 (コンセンサス配列) をファクターIX cDNAクローン由来の2つのリーダー配列の1つに連結した。このストラテジーを図10中に要約する。

【0100】ヒト-ファクターIXをコードするcDNAをヒト-肝臓からのmRNAから造成されたライブラリー (Kurachi 及び Davie、前掲) から得た。ファクターIX配列をpBR322ベクターからPstI消化により単離し、そしてpUC13のPstI部位に挿入した。

このプラスミドをFIX-pUC13と命名した。cDN Aクローニングの結果としてファクターIX挿入部の5'末端に存在するG-リッチ領域を除去するため、合成オリゴヌクレオチドアダプターによりクローン化断片の5'末端を置換した。オリゴヌクレオチドZC212及びZC213(表1)を合成し、そしてこれらをアニールして22塩基対オーバーラップを生じさせ、断片の末端をフィル-インし、そして適当な制限エンドヌクレアーゼで切断し、そして得られた断片をファクターIX配列に連結した。

【0101】アダプターを造成するため、100pmole ずつのZC212及びZC213を凍結乾燥し、そして100 μ lの10Xキナーゼ/リガーゼ緩衝液(600mM Tris, pH8.0, 100mM MgCl₂, 100mM DTT)及び86 μ lの水中に再懸濁した。アニール反応を65℃にて10分間行い、この混合物を徐々に室温に冷去し、そして氷上に置いた。この混合物に4 μ lの2.5mM dNTP混合物及び1 μ l(8ユニット)のT₄ DNAポリメラーゼを加えた。反応を14℃にて40分間行った。次に、100 μ lの5M NH₄OAcを加え、そしてDNAをフェノール/CHCl₃により1回、そしてCHCl₃により2回抽出し、そしてエタノールにより沈澱せしめた。DNAを遠心分離し、100 μ lのメデュウムサルト緩衝液(Maniatis等、前掲、100頁)中に再懸濁し、9ユニットのPst I及び8ユニットのCfo Iで消化し、そして上記のようにして抽出した。

【0102】次に、0.16pmoleの合成Pst I-Cfo Iアダプター断片、0.14pmoleのFIX-pUC13由来Cfo I-BamHIファクターIX断片、及び0.14pmoleの2.7kb BamHI-Pst I pUC13ベクター断片を、60mM Tris-HCl, pH7.5, 10mM MgCl₂, 10mM DTT、及び0.9ユニットのT₄ リガーゼを含有する200 μ lの反応混合物中で混合することにより変形されたファクターIX配列を造成した。この反応混合物を室温にて3時間インキュベートし、そしてこれを用いてコンピテントE. coli JM83 (Messing, Recombinant DNA Technical Bulletin, NIH Publication No.79-99, 2, No.2, 43-48, 1979)を形質転換した。

【0103】これらの細胞を50 μ lの2%X-gal(5ブromo-4-クロロ-3インドリル- β -D-ガラクトシド)と共に、40 μ g/mlのアンピシリンを含有するLB-ブロス上にプレートし、そして37℃にて一夜インキュベートした。白色コロニーを、アンピシリンを含有する他のプレートに拾い上げ、そして37℃にて一夜増殖せしめた。コロニーをワットマン540ペーパーにプロットし、そしてこのペーパーをWallace等(Gene, 16:21, 1981)の方法によるハイブリダイゼーションのために用意した。但し、クロラムフェニコールプレ

ート上での一夜のインキュベーションは省略した。

【0104】ペーパーを、44℃にて2時間、0.9M NaCl, 0.09M Tris-HCl, pH7.5, 6mM EDTA, 0.5%ノニデット(Nonidet) P-40, 150 μ g/ml E. coli RNA中でインキュベートした。ペーパーを、変形された5'末端配列に特異的な14-merである³²P-ラベルされたZC235(表1)によりプローブした。フィルター当り1~2 \times 10⁶cpmを用いるハイブリダイゼーションを44℃にて前ハイブリダイゼーション緩衝液中で一夜行なった。次に、フィルターを、6 \times SSC, 0.1%SDS中4℃にて3回、及び2 \times SSC, 0.1%SDS中4℃にて3回洗浄し、そしてX線フィルムに暴露した。2個の陽性クローンが得られた。これらのクローンの1つをFIX(-G)→pUC13と命名した。

【0105】FIX(-G)-pUC13造成物のファクターIX部分の変形された領域の配列を確認するため、BRL逆プライマーを用いるpUCプラスミド上で直接にジデオキシ配列決定を、Wallace等、1981(前掲)の方法により、Chaconas等(前掲)の方法によりポリヌクレオチドキナーゼ及び³²P-ATPを用いて末端ラベルされたプライマーを用いて行なった。配列は予想通りであった。

【0106】生ずる組換えプラスミドは3個のHae III開裂部位を含み、第1の部位はファクターIX配列中の39位(番号は、Anson等、前掲、の公表された配列に基き第1ATGから始まる)に位置し、第2の部位は130位に位置し、そして第3の部位はpUC13ポリリンカー中に位置する。130部位はブレプロ-ファクターIX分子のLys-Argプロセシング部位のコドンから1塩基対上流である。最終ファクターIX-ファクターVIハイブリド造成物中で、39位又は130位で終るファクターIXリーダー配列を、予想コンセンサス配列及びファクターIXリーダー配列の最後の3コドンを含んで成る合成2本鎖断片に連結した。

【0107】合成コンセンサス断片は、オリゴヌクレオチドZC286~ZC289(表2)を組合わせて2本鎖断片を形成することにより調製した。100pmole ずつのオリゴヌクレオチドを凍結乾燥し、そして200 μ lの1Xキナーゼ緩衝液中に再懸濁し、そして4℃にて一夜インキュベートし、次に65℃にて10分間加熱した。キナーゼ処理されたオリゴヌクレオチドを用いて2つのプールを作った。プール1はZC286+ZC287を含み、プール2はZC288+ZC289を含有した。プールされた対を65℃にて10分間アニールし、そして2時間にわたって室温に冷却し、そして氷上に30分間置いた。

【0108】変形されたファクターIX断片をFIX(-G)→pUC13からHindIII-EcoRI断片として取り出した。約20 μ gのプラスミドを、4 μ gの

RNアーゼAを含有する100 μ lのHindIII 緩衝液(BRL)中30ユニットずつのHindIII 及びEcoRIにより37 $^{\circ}$ Cにて一夜消化した。65 $^{\circ}$ Cにて10分間加熱することにより反応を停止し、そしてベクター及びファクターIX断片を1%アガロースゲル上で電気泳動し、そして電気溶出により精製した。ファクターIX断片をエタノールで沈澱せしめ、100 μ g/ μ lのRNアーゼAを含有する緩衝液中に再懸濁し、そして9ユニットのHaeIIIを用いて37 $^{\circ}$ Cにて一夜消化した。

【0109】HindIII-HaeIII 39塩基対ファクターIX断片をこの消化物から1.5%アガロースゲル上での電気泳動及びそれに続く電気溶出により単離した。HindIII-HaeIII 130塩基対ファクターIX断片を得るため、FIX-pUC13をEcoRI及びHindIIIで消化し、そしてファクターIX断片を上記のようにして単離した。約3 μ gのこのHindIII-EcoRI断片を6ユニットのHaeIIIにより37 $^{\circ}$ Cにて消化し、そしてアリコートを経過5分間隔で30分間にわたり、50mM EDTAを含有する溶液を取り出した。アリコートをプールし、そしてHindIII-HaeIII 130塩基対断片を5%アクリルアミドゲル上での電気泳動及びそれに続く電気溶出により精製した。

【0110】最終ファクターIX-コンセンサス配列ハイブリッドを、4部連結において、オリゴヌクレオチドプール1及び2、ファクターIX-HindIII-HaeIII (39又は130塩基対)、並びにpUC13-HindIII-EcoRIを連結することにより調製した。得られるプラスミドを用いてE. コリHB101(ATCC 33694)を形質転換した。DNAをEcoRI及びHindIIIにより消化することによりコロニーをクリーニングした。合成コンセンサス配列に連結した39塩基対ファクターIX配列を含んで成る配列をmini-FIX-FVIIと称する。

【0111】この造成物を含有するプラスミドをpM7200(-C)と称する。合成コンセンサス配列に連結された130塩基対ファクターIX配列を含んで成る配列をmaxi-FIX-FVIIと称する。この造成物を含有するプラスミドをpM7100(-C)と称する。このコンセンサス配列は、アミノ酸配列 Ala-Asn-Ala-Phe-Leu-Gla-Gla-Arg-Pro-Gly-Ser-Leu-Gla-Arg-Gla-Cys-Lys-Gla-Gln-Cys-Ser-Phe-Gla-Gla-Ala-Arg-Gla-Ile-Phe-Gla-Gly-Leu-Asn-Arg-Thr-Lys-Leuを含んで成るポリペプチドをコードする。

【0112】B. ファクターIX-コンセンサス配列ハイブリッド断片のファクターVII cDNAクローンへの連結ファクターIX-コンセンサス配列ハイブリッド(mini又はmaxi)を、3部連結において、ファクターVII cDNAの5'部分及びベクターpUC13に連結した(図11及び図12)。RNアーゼA(400ng/ μ l)を含有するHindIII 緩衝液中で6 μ gのpUC

13を10ユニットずつのXbaI及びHindIIIで消化することによりベクター断片を得た。上記のように2 μ gのpM7200(-C)を10ユニットずつのHindIII及びEcoRIにより消化してmini-FIX-FVII断片を調製した。

【0113】同様にしてpM7100(-C)からmaxi-FIX-FVII断片を調製した。pUC13にサブクローニングされたpUCVII 2115のEcoRI-XbaI 5'断片を含んで成るプラスミドpUC705から、XbaI及びEcoRIによる消化によって、ファクターVII cDNAの5'部分を調製した。この消化は37 $^{\circ}$ Cにて2時間行い、そして生成物を1.5%アガロースゲル上での電気泳動により分離した。目的とする断片を電気溶出し、フェノール/CHCl₃及びCHCl₃で抽出し、そしてエタノールで沈澱させた。

【0114】次に、3断片、すなわちpUC13/XbaI-HindIII、ファクターIX-ファクターVII(mini又はmaxi)/HindIII-EcoRI、及び5'ファクターVII/EcoRI-XbaIを、2 μ lの20mM ATP及び0.9ユニットのT₄ DNAリガーゼを含有するリガーゼ緩衝液20 μ l中で4 $^{\circ}$ Cにて一夜連結した。HindIII及びXbaIによる制限分析によってコロニーをスクリーニングした。mini-又はmaxi-FIX-FVII配列を含有する組換えプラスミドをそれぞれpM7200及びpM7100と命名した(図11)。

【0115】正しいイン-フレームコード配列を形成するため、ファクターVII cDNAの調製において使用したリンカーに基いて融合配列内に変形を行わなければならなかった。mini-融合体及びmaxi-融合体の両者は、ファクターIX-コンセンサス配列ハイブリッドとファクターVII cDNAとの間の連結部にEcoRI部位を含有する(cDNAクローニング過程の人工物である)。さらに、mini-融合体は、HaeIII部位において配列を5' AGGCCA3' から5' AGGCCCA3' に変え、そしてこの配列の下流に正しいリーディングフレームを確立するために、Cの付加を必要とする。

【0116】これらの訂正は、Zoller及びSmith(Manual for Advanced Techniques in Molecular Cloning Course, コールドスプリングハーバーラボラトリー、1983)により2プライマー法について記載されているのと実質的に同様の方法により、オリゴヌクレオチド指令部位特定変異誘発により行った。mini-FIX-FVII断片をpM7200からHindIII及びXbaIによる消化により取り出し、そしてM13mp19に挿入した。maxi-FIX-FVII断片を、同様にしてpM7100から精製し、そしてサブクローニングした。EcoRI部位の除去及び塩基の挿入のために、それぞれ変異誘発プライマーZC333及びZC336(表2を参照のこと)を使用した。

【0117】各場合に、第2プライマーとしてユニバーサルプライマー-ZC87を使用した。変異誘発プライマーは40pmoleのプライマー及び60pmoleのATPを1ユニットのT₄ DNAキナーゼと共に60℃にて一夜リン酸化した。maxi-FIX-FVII ハイブリッドからEcoRI部位を除去するため、1μgのM13単鎖鎖型を20pmoleずつのZC333及びZC87と、全溶10μl中で一緒にした。プライマーを60℃にて10分間鎖型とアニールし、5分間室温に冷却し、次に5分間氷上に置いた。DNAポリメラーゼI (Klenow断片) を用いてプライマーを延長した。

【0118】mini-FIX-FVII ハイブリッド中のEcoRI部位を除去しそしてリーディングフレームを正しくするため、1μgの該当するM13単鎖鎖型を20pmoleずつのZC333、ZC336及びZC87と一緒にした。上記のようにしてアニール及びプライマー延長反応を行った。ブランクリフトを、³²P-ラベルプライマー (ZC333又はZC336) を用いて60℃にてスクリーニングし、そしてジデオキシ配列決定法により配列を確認した。maxi-FIX-FVII 又はmaxi-FIX-FVII を含んで成る造成物をそれぞれpM7111及びpM7211と命名した。

【0119】コンセンサス配列は、ファクターVII について得られた蛋白質配列データと一致しない幾つかの領域を含有する (図8及び図9)。ファクターVII のアミノ末端部分との一層大きな相同性を有するポリペプチドをコードする配列を得るため、コンセンサス配列をオリゴヌクレオチド指令部位特定変異誘発により変形した。この変形は8位におけるLeuの挿入、18位 (8位の挿入後のアミノ酸位置に関する) におけるLysとIleの置換、26位におけるAlaとAsnの置換、及び32-34位におけるGly-Leu-AsnとAla-Ser-Aspの置換 (仮のアミノ酸配列データに基づく) から成る。

【0120】8位及び18位の配列変化は鎖型としてpM7111 (センス鎖) を用いて行った。前記のようにしてプライマー-ZC352 (5' CCC AGG TCT CAG CTC CTCCAG 3') 及びZC353 (5' CTG CTC CTC CTT A CA CTC TCT 3') を鎖型にアニールし、そして延長した。得られるファージクローンをpM7114と命名した。pM7114中の挿入部の配列をジデオキシ配列決定法により確認した。

【0121】同様にして、位置26-34の変化をpM7114鎖型 (センス鎖) 上で、変異誘発プライマー-ZC366 (5' CAG CTT CGT CCT GTT CAG GCC CTC GAA GATCTC GCG GGC CTC CTC GAA 3') を用い、ZC87 (表1) を第2プライマーとして行った。得られた造成物をpM7115と命名した。M13ベクター中の全550bp挿入部の配列をジデオキシ法により決定し、そして正しいことを見出した。

【0122】例5. ファクターIX-ファクターVII cD

NA融合体の造製

ファクターIX-ファクターVII cDNA融合体を、Kurachi及びDavie (前掲) により記載されているようにしてヒト-肝臓cDNAライブラリーから得られたファクターIX cDNAと例1に記載したファクターVII cDNA配列とを使用して調製した。

【0123】ハイブリッド蛋白質について選択された融合点はファクターIXのアミノ酸+38 (スレオニン) とファクターVII cDNA配列によりコードされる第1リジンとの間であった。この蛋白質は、ファクターIX cDNAの最初の252bp及びpUCVII 2115ファクターVII cDNA配列の最初の2コドンを除くすべてから成る配列によりコードされるであろう。このハイブリッド配列を造成するため、便利な制限部位を用いてファクターIX配列をまずpUCVII 2115に融合せしめた。この融合は、完全ファクターVII cDNA配列に連結されたファクターIX cDNAの最初の310bpを含有するプラスミドFIX/VII /12 (下に記載する) をもたす。ハイブリッド蛋白質のために望ましい正確な連結を達成するため、介在 (intervening) 塩基対をオリゴヌクレオチド指令変異誘発により除去した。

【0124】ファクターIX cDNA配列とファクターVII cDNA配列との連結を、FIX (-G) -pUC13 (例4) の0.3kb HindIII -AhaIII 断片とpUCVII 2115 (図12) からの4.7kb SmaI -HindIII 断片とを連結することにより達成した。40μlのメデュウムサルト緩衝液 (Maniatis等、前掲) 中で3μgのFIX (-G) -pUC13を40ユニットのHindIIIで37℃にて4時間消化することによりHindIII -AhaIII 断片を調製した。

【0125】次に容積を100μlのメデュウムサルト緩衝液に増加し、そして5ユニットのAhaIIIを加え、そしてインキュベーションを37℃にて18時間続けた。DNA断片を上記のようにして1%アガロース上での電気泳動により分離し、そして0.3kbのバンドを単離した。3μgのpUCVII 2115を30μlの反応容積中で25℃にて1時間、4.8ユニットのSmaIと共にインキュベートすることによりpUCVII 2115のSmaI部分消化を行った。65℃にて15分間のインキュベーションにより反応を停止した。次にサンプルを同容量のフェノールで抽出し、そしてエタノール沈澱を行った。

【0126】10分間のマイクロフュージスピンによって沈澱を集め、70%のエタノールですすぎ、そして空気乾燥した。DNAを30μlのメデュウムサルト緩衝液に再溶解し、そして30ユニットのHindIIIにより37℃にて3時間消化した。DNAを上記のようにして0.7%アガロース中での電気泳動にかけ、そして4.7kb Hind-SmaI断片を単離した。P等モル量の2つの断片 (0.048pmole) を、50mM Tri

35

s-HCl, pH7.5, 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 1mM ATP, 及び3ユニットのT₄ DNAリガーゼを含有する10μlの反応溶液中で連結し、そしてコンピテントE, コリRR1 (ATCC31343) を形質転換した。細胞をアンピシリンプレート上で増殖せしめ、そして生ずるコロニーの内の12個を制限酵素消化により目的プラスミド造成物の存在についてスクリーニングした。コロニー12からのDNA (FIX/VII/12) が予想通りの制限酵素消化パターンをもたらし、そして次のハイブリッド遺伝子造成の段階で使用した。

【0127】オリゴヌクレオチド指令変異誘発法を単鎖DNA鋳型上で行った。すなわち、融合したファクターIX/ファクターVII 配列をM13mp19中にクローニングすることが必要であった。便利な小DNA断片を得るため、FIX/VII/12から640bp HindIII-XbaI断片を単離した。この断片はファクターIXc DNAの5' 末端の310bp及びファクターVII 断片の330bpを含有する。1μgのM13mp19 RF DNAを40μlのメデュウムサルト緩衝液中で20ユニットのHindIII 及び20ユニットのXbaIで37℃にて18時間消化することによりベクターを調製した。DNAを前記のようにして1.2%アガロース中での電気泳動にかけ、そして線状6.4kb断片をゲルから単離した。

【0128】5μgのFIX/VII/12 DNAを40μlのメデュウムサルト緩衝液中で10ユニットのXbaIにより37℃にて18時間消化した。20ユニットのHindIII を加え、そして消化を37℃にてさらに7時間続けた。生ずる断片を前記のようにして1.2%アガロース中での電気泳動により分離し、そして640bp断片を溶出した。10ngの線状化されたM13mp19及び1ngの640bpを14℃にて1時間連結し、そして次にコンピテントE, コリJM101を形質転換した (Messing, Meth.in Enzymology, 前掲)。細胞をX-gal 及びIPTGと共にプレートし (Messing, Meth.in Enzymology, 前掲) そして8個の淡青色のプラークを拾い、そしてE, コリJM103の培養物 (A₆₀₀ = 0.3) 2.5mlに感染させた。

【0129】37℃にて18時間の増殖の後、細胞を室温臨床遠心分離機中での遠心分離により取得し、そしてM13ファージを含有する上清20μlを10μg/lのエチジウムブロミドと混合した。既知の標準との比較により、8個のクローンのそれぞれはほぼ正しいサイズの挿入部を有していた。次に、Messing (Meth.in Enzymology 前掲) により記載されていたようにして1.5mlの上清から単鎖DNAを調製した。次に、プライマーとしてオリゴヌクレオチドZC87を用いてジデオキシ法によりこの造成物を配列決定し、挿入連結部が正しいことを確認した。正しいクローンの1つ (#4) を鋳型として使用してオリゴヌクレオチド指令変異誘発により機

36

能的ファクターIX-ファクターVII 融合体を調製した。

【0130】オリゴヌクレオチドプライマー、すなわち10bpの目的とするファクターIX配列及び10bpの目的とするファクターVII 配列から成る20-mer (表1及び表2) を変異誘発プライマーとして使用した。M13mp19配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドZC87を第2プライマーとして使用した。使用した変異誘発法はZoller及び Smith (前掲) の方法の変化であった。アニーリング反応のため、20pmole のZC249を、20μlの60mM Tris-HCl, pH8.0, 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 1mM ATP, 1ユニットのT₄ キナーゼ中で4℃にて一夜インキュベートすることによりリン酸化した。65℃にて15分間加熱することにより反応を停止し、そしてサンプルを凍結乾燥した。

【0131】1pmole の単鎖クローン#4鋳型及び20pmole のZC87を10μlのアニーリング緩衝液 (200mM Tris-HCl, pH7.5, 100mM MgCl₂, 500mM NaCl, 10mM DTT) に加えた。サンプルを65℃にて10分間加熱し、室温にて5分間インキュベートし、そして次に氷上に置いた。10μlの次の溶液を新しく調製し、そしてサンプルに加えた。20mM Tris-HCl, pH7.5, 10mM MgCl₂, 10mM DTT, 1mM dNTP, 1mM ATP, 0.15ユニット/μlのT₄ DNAリガーゼ、0.25ユニット/μlのE, コリDNAポリメラーゼI (Klenow断片)。次に、反応混合物を15℃にて3時間インキュベートし、そしてこのサンプルを使用してコンピテントE, コリJM101を形質転換した (Messing, Meth.in Enzymology, 前掲)。

【0132】生ずるファージをニトロセルロース上に上げ、そして³²P-ラベルZC249にハイブリダイズせしめることによりスクリーニングした。乾燥したBA85フィルター (シュリーヒェル&シュール, 0.45μm) を寒天プレート上に置き、そしてファージを5分間吸着させた。フィルターを取りはずし、そして5分間乾燥させ、0.5N NaOH及び1.5M NaClで飽和されたワットマン3MMペーパー上に5分間置き、3分間空気乾燥し、1M Tris-HCl (pH8) 及び1.5M NaClで飽和されたワットマンペーパー上に5分間置き、そして3分間空気乾燥した。Tris-HClの段階を反復し、そしてフィルターを100mlの6×SSC中で室温にて2分間すすいだ。空気乾燥した後、フィルターを80℃にて2分間加熱し、47℃ (ZC249のT_m-4℃) にて一夜、6.7×SSC, pH6.2, 2mg/mlのE, コリtRNA, 並びに0.2w/v%ずつのBSA、フィコール及びポリビニルピロリドン中で前ハイブリダイズせしめた。

【0133】前ハイブリダイゼーション段階の後、フィルターを2.5×10⁶cpm/フィルターのラベルされた

37

ZC249と共に同じSSCハイブリダイゼーション緩衝液中で47℃にて一夜インキュベートした。ハイブリダイゼーションの後、フィルターを5~10分間ずつ3回室温にて6×SSC中で洗浄し、そしてX線フィルムに暴露した。仮定の陽性ブランクを再プレートし、そして上記のようにしてスクリーニングした。次に個々のブランクを拾い上げ、そして再鎖DNAを調製し、そしてプライマーとしてZC275を使用して配列決定した。オリゴヌクレオチドZC275は、同じ鎖上のZC249の5'方向の配列40bpに対応する(表1)。

【0134】4個の陽性ブランクが同定された。1個のクローンについてM13mp19中の全挿入部を、オリゴヌクレオチドZC87及びZC275を用いてジデオキシ法により配列決定し、そして正しいことを決定した。確認された配列は図14中塩基1-567により示される。次に、このクローンからのRF DNAをハイブリド遺伝子の造成の最終段階において使用した。

【0135】最終造成を行うために次の3断片を使用した。融合したIX/VII配列を含有するFIX/VII-9からの0.6kb HindIII-XbaI断片; pUCVII 1923からの1.7kb XbaI-BamHIファクターVII cDNA断片; 及びpUC13の2.7kb BamHI-HindIII断片である。3μgのFIX/VII-9 (RF DNA) を50μlの容積中で45ユニットのXbaIにより37℃にて6時間消化した。DNAをエタノールで沈澱せしめ、再懸濁し、そして50ユニットのHindIIIにより37℃にて4時間消化した。サンプルを1%アガロース中での電気泳動にかけ、そして0.6kbのバンドをNA45ペーパー(シュリーヘル&シュール)上に電気溶出した。DNAをこのペーパーから1.5M NaCl、50mM Tris-HCl、pH8、1mM EDTAにより溶出し、フェノール抽出し、そしてエタノールで沈澱せしめた。

【0136】残りのファクターVII cDNA配列を得るため、5μgのpUCVII 1923を40μlのメデュウムサルト緩衝液中で36ユニットのXbaIにより37℃にて3時間消化した。次に、8μlの10倍塩緩衝液、28μlの水、及び4μl(40ユニット)のBamHIを加え、そして反応混合物を37℃にて3時間インキュベートした。DNA断片を、1%アガロース中での電気泳動により分離し、そして上記のようにして1.7kb断片を単離した。

【0137】1μgのpUC13を20μlのメデュウムサルト緩衝液中で10ユニットのHindIIIにより37℃にて1時間消化することによりベクター断片を調製した。次に、2μlの10倍高塩緩衝液及び10ユニットのBamHIを加え、そしてインキュベーションをさらに2時間続けた。上記のようにして、DNAを1%アガロースゲル上で精製した。

【0138】等モル量(およそ0.56 pmole)の3種

38

類の断片を室温にて45分間、10μlの50mM Tris-HCl、pH7.5、10mM MgCl₂、1mM DTT、1mM ATP及び3ユニットのT₄ DNAリガーゼ中で連結した。この反応混合物を用いてコンピテントE. コリJM83を形質転換した。細胞を、50μl/プレートの2%X-galが添加された、40μg/mlのアンピシリンを含有する培地上にプレートした。7個の白色コロニーからDNAを調製し、そして次に制限酵素消化によりスクリーニングした。正しいパターンを示すクローンの1つをFIX/VII → pUC13と命名した。

【0139】例6. 生物学的に活性なファクターVII類似体の発現

哺乳類細胞発現ベクターpD2を、トランスフェクトされた動物細胞中でのFIX/VII遺伝子の発現のために選択した。これは、プラスミドpDHFR-III (Berkner 及び Sharp, Nuc. Acids Res., 13, 841-857, 1985) から、次のようにして造成された。pDHFR III中のDHFR cDNAに隣接するPst I部位を、常用のリンカー付加法 (Scheller, R.H., Dickerson, R.E., Boyer, H.W., Riggs, A.D., 及びItakura, K., Science, 196:177-180, 1977) によりBamHI部位に転換した。pDHFR III DNAを10mM Tris、pH7.6、6mM β-MSH、6mM NaCl、10mM MgCl₂ 及び2.5ユニットのPst Iと共に37℃にて10分間インキュベートし、次にフェノール抽出及びエタノール沈澱を行った。Pst I接着末端を、T₄ DNAポリメラーゼを用いて平滑末端化した。

【0140】フェノール抽出、及び10mM Tris、pH8.0、1mM EDTA、0.3M NaClに対する透析の後、DNAをエタノール沈澱せしめた。DNAを20μlの1.4mM ATP、50mM Tris、pH7.6、10mM MgCl₂、1mM ジチオスレイトール中に再懸濁し、そして次に5ngのT₄ ポリヌクレオチドキナーゼ処理されたBamHIリンカー(ニューイングランドバイオラプス) 及び200ユニットのT₄ ポリヌクレオチドリガーゼと共に12℃にて12時間インキュベートし、次にフェノール沈澱及びエタノール沈澱を行った。

【0141】DNAを90ユニットのBamHIにより37℃にて1時間消化し、次に1.4%アガロースゲルにより電気泳動した。4.9kb DNA断片(DHFR cDNA及びSV40ポリアデニレーションシグナルを欠くpDHFR III DNAに相当する)を電気溶出し、そしてポリヌクレオチドリガーゼにより再環化し、そして次にE. コリHB101にトランスフェクトした。アンピシリン感受性コロニーを迅速アプレ分析 (Birnbom, H.C., 及び Doly, J., Nucleic Acids Research, 7:1513-1523) によりスクリーニングし、そして正しいクローンを増殖させて大規模プラスミドDNA調製

を行った。

【0142】生ずるプラスミドを20ユニットのBamHIで開裂せしめ、そして2.5 μ gのウシ腸ホスファターゼで処理し、そして1.4%アガロースゲル上で電気泳動した。25 μ gのpSV40 (pBR322のBamHI部位に挿入されたSV40 DNAのクローン)を25ユニットのBclIにより50℃にて1時間消化し、次に25ユニットのBamHIを添加し、そして37℃にて1時間インキュベーションを続けた。次に、このDNAを1.4%アガロースゲル上で電気泳動した。

【0143】BamHI切断ベクター(すなわち、ポリアデニレーションシグナルを欠くベクター)を、後期ポリアデニレーションシグナルを含有するSV40 DNA断片(0.14-0.19マップユニット[Tooze等、J.編、"DNA Tumor Viruses, Molecular Biology of Tumor Viruses"]に、ゲル精製された断片(0.1 μ gずつ)を20 μ lの50mM Tris、pH7.6、10mM MgCl₂、1mMジチオスレイトール、1.4mM ATP及び100ユニットのT₄ポリヌクレオチドリガーゼ中で12℃にて4時間インキュベートすることにより連結し、そしてE. コリRR1を形質転換した。陽性クローンを迅速プレア分析により同定し、そして正しいDNA、すなわちpD2の大規模調製を行った。

【0144】ファクターIX/VII 発現造成物を作成するため、1 μ gのpD2を20ユニットのBamHIにより20 μ lの高塩緩衝液中で37℃にて1時間消化した。次に、20 μ lの10mM Tris-HCl、pH8、1mM EDTA及び1ユニットのウシアルカリ性ホスファターゼ(ペーリンガー)を加えた。反応混合物を37℃にて1時間インキュベートし、そして75℃にて10分間加熱することにより停止した。10 μ gのFIX/VII →pUC13を150 μ lの高塩緩衝液中で150ユニットのBamHIにより37℃にて2時間消化した。

【0145】DNA断片を1.2%アガロース中での電気泳動により分離し、そして2.3kb断片を単離した。等モル量(0.015pmole)の2.3kb BamHI断片及びpD2ベクター断片を14℃にて2.5時間上記のようにして連結した。この反応混合物を用いてE. コリRR1細胞を形質転換し、次にこれを10 μ g/mlのアmpiシリンを含有する培地上にプレートした。プラスミドDNAを生じたコロニーの内の12個から調製し、そして制限酵素消化によりスクリーニングした。正しい酵素消化パターンを示すクローンの1つをFIX/VII →pD2と命名した(図13)。FIX/VII →pD2により形質転換されたE. コリRR1はNo.53068としてATCCに寄託された。

【0146】FIX/VII →pD2により幼ハムスター腎臓(BHK)細胞(アメリカン・タイプ・カルチャー・

コレクションから受託番号CCL10として入手可能である)をトランスフェクトする方法は、公表されている方法(例えば、Wigler等、Cell, 14:725, 1978; Corsaro及びPearson, Somatic Cell Genetics, 7: 603, 1981; Graham及びVander Eb, Virology, 52: 456, 1973)に類似する。BHK細胞を60mm組織培養ペトリ皿中、ドルベコ培地(+10%熱不活性化ウシ胎児血清並びにグルタミン及びペニシリン-ストレプトマイシン)中で37℃、5%CO₂にて、20%のコンフルエンスまで増殖せしめた。

【0147】60mmペトリ皿1枚のトランスフェクトのために合計10 μ gのDNA、すなわち3.75 μ gのFIX/VII →pD2、1.25 μ gのpKO-neo (Southern及びBerg, J. Mol. Appl. Genet., 1: 327-341, 1982)、及び5 μ gのサケ精子DNAを使用した。DNAを0.3M NaOAc、75%のエタノール中で沈澱せしめ、70%のエタノールですすぎ、そして20 μ lの10mM Tris-HCl、pH8、1mM EDTAに再溶解した。DNAを440 μ lの水及び500 μ lの280mM NaCl、1.5mM NaHPO₄、12mMデキストロース、50mM HEPES、pH7.12中に再溶解した。60 μ lの2M CaCl₂を上記の混合物に滴加し、そして溶液を室温にて30分間置いた。次に、この溶液を細胞に加え、そして細胞を37℃にもどして4時間置いた。

【0148】培地を除去し、そして血清を含有するドルベコ培地中20%DMSOを5ml室温にて2分間にわたり加えた。次に、皿を培地で2回交換して迅速に洗浄し、そして新鮮な培地中で一夜インキュベートした。DNAを加えてから24時間後、培地を除去し、そして選択培地(血清を含有するドルベコ培地中10mg/mlのG418、498 μ g/mg、ギブコ)を加えた。10日及び13日の後、pKO-neo遺伝子を含有しそしてそれ故にG418に対して耐性である細胞を代表する個々のクローンを96ウエル(又は24ウエル)プレートに移し、そして蛋白質測定のために増殖せしめた。

【0149】細胞を、5 μ g/mlのビタミンK(フィトナジオン、メルク)を含有する、10%ウシ胎児血清が補充されたドルベコの培地に増殖せしめた。培地を遠心分離により細胞及び細胞片から分離し、そしてファクターVII ポリペプチド(ELISAによる)、及び生物学的活性について測定した。細胞をトリプシンによりプレートから取り出し、新鮮な培地で洗浄し、遠心分離し、そして-20℃にて凍結した。次に、細胞ペレットをPBS中で洗浄し、ペレット化し、そして0.25%トリトンX-100を含有するPBS中に再懸濁した。サンプルを稀釈し、そしてポリペプチド及び活性について測定した。

【0150】ファクターVII についてのELISAを次のようにして行った。ヒトファクターVII に対するモ

10

20

30

40

50

41

ノクローナル抗体 (0.1M Na_2CO_3 、pH9.6 中5 μl /ml) 200 μl を96ウェルマイクロタイタープレートの各ウェル中で37℃にて2時間インキュベートした。次にウェルを220 μl のPBS (pH7.2) 中1%ウシ血清アルブミン (BSA) 及び0.05%トウィーン20と共に37℃にて2時間インキュベートした。プレートを水ですすぎ、空気乾燥し、そして4℃にて貯蔵した。サンプルを測定するため、200 μl のサンプルを、抗体がコートされたウェル中で室温にて1時間インキュベートした。次に、ウェルを0.05%のトウィーン20を含有する200 μl のPBSで4回すすいだ。

【0151】次に、ウェルを、ファクターVII に対するラビット-ポリクローナル抗血清のIgG画分 (1%のBSA及び0.05%のトウィーン20を含有するPBS中5 μg /ml) 200 μl と共に室温にて1時間インキュベートした。次に、アルカリ性ホスファターゼと結*

42

*合したヤギ抗-ラビットIgGとインキュベートした。次に、ウェルを0.05%のトウィーン20を含有するPBSにより4回すすいだ。ウェルに、56 mg /lのMgCl₂を含有するジエタノールアミン緩衝液 (96ml/l)、pH9.8中に溶解したp-ニトロフェニルホスフェート (30 mg) 200 μl を加えた。37℃にて酵素反応を行い、そして黄色の発生をELISAプレートリーダーを用いて405nmでモニターした。細胞培地について得られた結果を表4に示す。

10 【0152】ファクターVII の生物学的活性はQuick (Hemorrhagic Disease and Thrombosis, 第3版、Leat Feigler, フィラデルフィア、1966) により記載されたワンステージ・クロッティングアッセイにより測定した。細胞培地について得られた結果を表4に示す。

【0153】

【表4】

日	細胞/ml ($\times 10^{-4}$)	ファクターVII ポリペプチド (ng/ml)	ファクターVII 活性 (ng/ml)
1	2.9 2.7	25	6.0
2	1.9 2.8	47	15.9
3	1.96 2.26	160	93
4	4.71 4.14	550	300
5	8.79 11.28	725	531
6	5.1 8.4	975	600

【0154】例7. ファクターIXの発現

14 μg のFIX (-G) \rightarrow pUC13を30 μl の高塩緩衝液中で30ユニットのBamHIにより37℃にて3時間消化した。次に、DNAを1%アガロースゲル中での電気泳動にかけ、そしてファクターIX配列を含有する1.4kbバンドをゲルから単離した。

【0155】3 μg のベクターpD2を30 μl の高塩緩衝液中で30ユニットのBamHIにより37℃にて3時間消化した。DNAを1%アガロース中での電気泳動にかけ、そして線状1.5kb断片を単離した。次に、DNAを30 μl の10mM Tris-HCl、pH8、1mM EDTA中で0.12ユニットのウシアルカリ性ホスファターゼにより37℃にて30分間処理した。塩を0.3M NaOAcに調製し、そしてサンプルをフェノールにて2回抽出し、クロロホルムで1回抽出し、そしてDNAをエタノール沈澱せしめた。ペレットを70%エタノール中ですすぎ、乾燥し、そして20 μl の10mM Tris-HCl、pH8、1mM EDTA中に再溶解した。

※【0156】等モル量 (0.02pmole) の2つの断片を上記のようにして10ユニットのT₄ DNAリガーゼにより連結した。反応混合物を使用してE. コリRR1細胞を形質転換した。生じたアンピシリン耐性コロニーの内の12コロニーからのDNAを制限酵素消化によりスクリーニングした。正しい方向に挿入された1.4kb断片を有するクローンの1つをFIX (-G) -pD2と命名した。FIX (-G) -pD2により形質転換されたE. コリRR1はNo. 53067としてATCCに寄託された。

【0157】BHK細胞を、上記のようにしてFIX (-G) -pD2及びpKOneoにより同時トランスフェクトした。薬剤耐性細胞を選択し、そして例6に記載したようにしてELISA及び活性測定のために用意した。生物学的活性の試験は、ファクターIX不足患者からの血漿の凝固時間を短縮するファクターIXの能力に基づく。これはProctor及びRapaport, Amer. J. Clin. Path., 36:212, 1961により記載されたようにして行った。

※50 結果を表5に示す。

【0158】

* * 【表5】

日	細胞/ml ($\times 10^{-4}$)	ファクターIX ポリペプチド ng/ml		ファクターIX 活性 ng/ml		上清中の 活性蛋白質 (%)
		上 清	ペレット	上 清	ペレット	
1	1.65	-	-	-	-	-
2	2.66	57 45	20 20	27 24		50%
3	9.69	150 120	60 60	72 84		58%
4	14.79	475 225	160 140	198 150		50%
5	50.85	875 1000	250 260	408 438		45%

【0159】ファクターIXポリペプチドの量は例6に記載したのと実質上同様にしてファクターIXに対するポリクローナルラビット抗血清を使用してELISA法により決定した。ウエルをファクターIX含有サンプルと共にインキュベートした後、ウエルを洗浄し、そして1%のBSA 0.05%のトウィーン20を含有するPBS中1:1000稀釈された、アルカリ性ホスファターゼと接合したアフィニティー精製されたラビットポリクローナル抗ファクターIXの200 μ lと共に室温にて1時間インキュベートした。次に、ウエルを、0.05%のトウィーン20を含有するPBSで4回すすぎ、そして酵素基質を上記のように添加した。4℃にて一夜、又は37℃にて2時間、インキュベーションを行った。

【0160】表5に示すように、ファクターIXの70～80%が培地中に分泌され、そしてその約50%が生物学的に活性であった。細胞ペレット中にはファクターIX活性は検出されなかった。細胞培養培地に1～10mg/mlの濃度でビタミンK (フィトナジオン、メルク)を補充することにより最も高レベルの活性が達成された。

【0161】細胞が真正なファクターIXを分泌することを証明するため幾つかの追加の分析を行った。上記の測定に従ってファクターIX活性を含有するサンプルをファクターVII 不足血漿とインキュベートしたが凝固時間には影響を与えず、活性が非特異的凝固剤ではなく真正なファクターIXに基づくことが示された。この結果はさらに特異的異体によりファクターIX活性がサンプルから涵濁することにより確認された。ファクターIX活性の97～98%が、ファクターIXに対するラビットポリクローナル抗体により細胞上清から免疫沈澱した。この抗体はまた正常血漿からファクターIX活性の99%以上を沈澱せしめた。エリスロポイエチンに対するラビットポリクローナル抗体によっては上清からファクターIX活性が除去されなかった。

※【0162】例8. ファクターVII のための発現ベクターの造成

20 部分的ファクターVII cDNAに連結された合成ファクターVII 5' コード領域を含んで成る発現ベクターを造成した。pM7115からのファクターIXリーダー-5' ファクターVII 配列、及びFIX/VII /pD2からの3' ファクターVII 配列を、SV40エンハンサー並びにアデノウイルス2主要後期プロモーター及びトリパルタイトリーダーを含むプラスミドpD3に挿入することによりpM7135と称するベクターを生じさせた。

【0163】プラスミドpD3はプラスミドpDHFR III から得られた。pDHFR III中のDHFR配列からすぐ上流のPst I部位を次のようにしてBcl I部位に転換した。10 μ gのプラスミドを100 μ lの緩衝液A (10mM Tris, pH8, 10mM MgCl₂, 6mM NaCl, 7mM β -MSH) 中で37℃にて10分間5ユニットのPst Iにより消化した。

【0164】DNAをフェノール抽出し、EtOH沈澱せしめ、そして10mM dCTP及び16ユニットのT₄ DNAポリメラーゼを含有する40 μ lの緩衝液B (50mM Tris pH8, 7mM MgCl₂, 7mM β -MSH) 中に再懸濁し、そして12℃にて60分間インキュベートした。EtOH沈澱の後、DNAを、400ユニットのT₄ ポリヌクレオチドリガーゼを含有する14 μ lの緩衝液C (10mM Tris, pH8, 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 1.4mM ATP) 中で2.5 μ gのキナーゼ処理されたBcl Iリンカーに、12℃にて12時間連結した。

【0165】フェノール抽出及びEtOH沈澱の後、DNAを120 μ lの緩衝液D (75mM KCl, 6mM Tris, pH7.5, 10mM MgCl₂, 1mM DTT) 中に再懸濁し、80ユニットのBcl Iで50℃にて60分間消化し、そしてアガロースで電気泳動した。

※50

フォームIII プラスミドDNA (10 μ g) をゲルから単離し、そして50ユニットのT₄ ポリヌクレオチドリガーゼを含有する10 μ lの緩衝液C中で12℃にて2時間連結し、そしてこれを用いてE. コリHB101を形質転換した。陽性コロニーを迅速DNA調製分析により同定し、そして陽性コロニーから調製されたプラスミドDNA (pDHFRI' と称する) をdAM⁻ E. コリに形質転換した。

【0166】次に、下記のようにしてプラスミドpD 2' を得た。pDHFRI' (15 μ g) 及びpSV40 (25 μ g) を100 μ lの緩衝液D中で25ユニットのBcl Iを用いて50℃にて60分間開裂せしめ、次に50ユニットのBamHIを加えて37℃にて60分間さらにインキュベートした。DNA断片をアガロースゲル電気泳動により分離し、そして4.9kb pDHFRI' 断片及び0.2kbSV40断片を単離した。これらの断片 (200ngのpDHFRI' 及び100ngのSV40 DNA) を100ユニットのT₄ ポリヌクレオチドリガーゼを含有する10 μ lの緩衝液C中で12℃にて4時間インキュベートし、そして生成した造成物 (pD 2') を用いてE. コリRR1を形質転換した。

【0167】pBR322領域中の“毒性 (poison)” 配列 (Lusky 及びBotcham, Nature, 293, 79-81, 1981) を除去することによりプラスミドpD 2' を変形した。プラスミドpD 2' (6.6 μ g) 及びpML-1 (Lusky 及びBotcham, 前掲) (4 μ g) を50 μ lの緩衝液A中で10ユニットずつのEcoRI及びNru Iにより37℃にて2時間インキュベートし、そしてアガロースゲル電気泳動を行った。1.7kb pD 2' 断片及び1.8kb pML-1断片を単離し、そして100ユニットのT₄ ポリヌクレオチドリガーゼを含有する20 μ lの緩衝液C中で12℃にて2時間相互に連結し、次にE. コリHB101に形質転換した。目的とする造成物 (Δ pD 2' と称する) を含有するコードを迅速調製分析により同定した。次に10 μ gの Δ pD 2' を50 μ lの緩衝液A中で20ユニットずつのEcoRI及びBgl IIにより37℃にて2時間消化した。DNAをアガロースにより電気泳動し、そしてpBR322の3' スプライス部位及びポリA配列を含有する目的の2.8kb断片 (断片C) を単離した。

【0168】pD 3の造成において使用される残りの断片を得るため、SacII (SstII) 部位をHindII I 部位又はKpn I部位のいずれかに転換するようにpDHFRIII を変形した。10 μ gのpDHFRIII を20ユニットのSstIIにより37℃にて2時間消化し、そして次にフェノール抽出及びエタノール沈澱を行った。再懸濁したDNAを10mM dCTP及び16ユニットのT₄ DNAポリメラーゼを含有する100 μ lの緩衝液B中で12℃にて60分間インキュベートし、フェノール抽出し、透析し、そしてエタノール沈澱し

た。DNA (5 μ g) を400ユニットのT₄ DNAリガーゼを含有する20 μ lの緩衝液C中で12℃にて10時間、50 μ gのキナーゼ処理されたHindIII 又はKpn Iリンカーと連結し、フェノール抽出し、そしてエタノール沈澱せしめた。

【0169】50 μ lの緩衝液A中に再懸濁した後、得られたプラスミドを適当であれば50ユニットのHindIII 又はKpn Iで消化し、そしてアガロースにより電気泳動した。ゲル単離したDNA (250ng) を400ユニットのT₄ DNAリガーゼを含有する30 μ lの緩衝液C中で12℃にて4時間連結し、そしてこれを用いてE. コリRR1を形質転換した。得られたプラスミドをpDEFRIII (HindIII) 及びpDHFRII (Kpn I) と命名した。次に、700bpKpn I-Bgl II断片 (断片A) をpDHFRIII (Kpn I) から、Bgl II及びKpn Iによる消化並びにこれに続くアガロースゲル電気泳動により精製した。

【0170】SV40エンハンサー配列を次のようにしてpDHFRIII (HindIII) に挿入した。50 μ gのSV40 DNAを120 μ lの緩衝液A中で50ユニットのHindIII と共に37℃にて2時間インキュベートし、そしてHindIII C SV40断片 (5089-968bp) をゲル精製した。プラスミドpDHFRIII (HindIII) (10 μ g) を250ngのウシ小腸ホスファターゼにより37℃にて1時間処理し、フェノール抽出し、そしてエタノール沈澱せしめた。線状化されたプラスミド (50ng) を、16 μ lの緩衝液C中で12℃にて3時間、200ユニットのT₄ ポリヌクレオチドリガーゼを用いて、250ngのHindIII C SV40と連結し、そしてE. コリHB101に形質転換した。次に、700塩基対のEcoRI-Kpn I断片 (断片B) をこのプラスミドから単離した。

【0171】pD 3の最終造成のため、断片A及びB (50ngずつ) を、200ユニットのT₄ ポリヌクレオチドリガーゼを用いて12℃にて4時間、10ngの断片Cと連結し、次にE. コリRR1を形質転換した。陽性コロニーを迅速調製分析により検出し、そしてpD 3の大規模調製を行った。次に、発現ベクターpM7135を造成した。pM7115の複製形をBamHI及びXba Iで消化し、そしてファクターIXリーダー及び5' ファクターVII 配列を含有する550塩基対断片をゲル精製した。プラスミドFIX/VII /pD 2' をXba I及びBamHIで消化し、そしてファクターVII cDNAの3' 部分を含んで成る1700bp断片をゲル精製した。プラスミドpD 3をBcl Iで消化し、ウシアルカリ性ホスファターゼで処理し、そして3個の断片を三重連結により連結した。得られた造成物を2000塩基対Xba I断片の存在についてスクリーニングした。正しい配列を有するプラスミドを選択し、そしてpM7135と命名した (図18)。

【0172】例9. cDNAクローンからのファクターVIIの発現

ファクターVII リーダーを含有するファクターVII cDNAを発現するため、λVII 2463、又はλVII 565及びλVII 2463からのDNAを、Ad2主要後期プロモーター、SV40エンハンサー配列、Ad2トリパルタイトリーダー、スプライスセット、及びSV40ポリアデニレーションシグナルを含有する発現ベクターにクローニングした。このベクターは、cDNAの挿入の部位としてユニークEcoRI配列を含有するように適合されている。60アミノ酸のリーダーをコードするλVII 2463からの配列の発現、及び-18から-39までのアミノ酸のコドンに欠き、そしてそれ故に38アミノ酸の長さのリーダーをコードするλVII 565及びλVII 2463からの配列の発現を評価した。

【0173】ファクターVII リーダーの構造はcDNAクローニングによってのみ同定されているため、及び2つの異なる5'-末端cDNAを得ることによって生じるあいまいさのため、本発明者等はさらにゲノム-cDNAファクターVII配列を造成した。λVII 2463の3'部分(エクソン2中のBglII部位からポリ(A)テイルへの3'リンカーのEcoRI部位まで)を、エクソン1a、1b及びエクソン2の残りをコードするクローン7mlのサブゲノム断片に連結した。EcoRI-BglII 4.4kb断片として再構成されたこのサブゲノム断片をλVII 2463 cDNAに連結し、そして哺乳類発現ベクターにクローニングした。

【0174】要約すれば、サブクローンを造成するため、λVII 2463のファクターVII cDNA EcoRI断片をpUC18のEcoRI部位にクローニングし、そしてpVII 2463と命名した。同様に、λVII 565のEcoRI cDNA挿入部をpUC18にサブクローニングし、そしてpVII 565と命名した。クローンpVII 565のファクターVII配列の5'部位とpVII 2463のファクターVII DNAの3'セグメントの間のハイブリッドを、次のようにして造成した。

【0175】すなわち、pVII 565の最も5'のEcoRI-BglIIファクターVII断片、及びpVII 2463のBglII-HindIIIファクターVII断片(pVII 2463のポリリンカー中のHindIII部位)をEcoRI及びHindIIIで消化されたpUC18にクローニングした。この造成物をpVII 2397と命名した。pVII 2463及びpVII 2397の挿入部をEcoRI消化により取り出し、そしてゲル濾過し、下記のようにして哺乳類発現ベクターに挿入した。

【0176】A. 十分な長さのファクターVII cDNAの発現

ファクターVIIの発現をベクターpDX中で達成した。このベクターはpD3(例8に記載した)及びpD3'

[このベクターはpD3と同じであるが、但しSV40ポリアデニレーションシグナル(すなわち、SV40 BamHI [2533bp]-BclI [2770bp]断片が後方向(late orientation)にある]から誘導した。従って、pD3'は遺伝子挿入の部位としてBamHI部位を含有する。

【0177】pDXを形成するため、pD3'中のEcoRI部位を、EcoRIによる開裂、S1ヌクレアーゼによるインキュベーション、及びこれに続くBclIリンカーとの連結により、BclI部位に転換した。DNAを陽性に同定されたコロニーから調製し、そして変化した制限部位を含有する1.9kb XhoI-PstI断片をアガロースゲル電気泳動により調製した。第2の変形において、BclIで開裂されたpD3をキナーゼ処理されたEcoRI-BclIアダプター(オリゴヌクレオチドZC525、5' GGAATTCT3'; 及びZC526、5' GATCAGAATTCC3'から造成される)と連結して、発現ベクターに遺伝子を挿入するための部位としてEcoRI部位を生じさせた。

【0178】陽性コロニーを制限エンドヌクレアーゼ分析により同定し、そしてこれからのDNAを使用して変形された制限部位を含有する2.3kb XhoI-PstI断片を単離した。上記の2つのDNA断片をT4 DNAリガーゼと共に一緒にインキュベートし、E. コリHB101に形質転換し、そして陽性コロニーを制限分析により同定した。pDXと称するこのようなDNAの調製を行った(図22)。このDNAをEcoRIで開裂せしめ、そして次にウシ小腸ホスファターゼと共にインキュベートした。次に、精製されたDNAをT4 DNAリガーゼ及びpVII 2463からのファクターVII EcoRI断片と、又はpVII 2397に由来する、ファクターVII EcoRI cDNA断片とインキュベートした。

【0179】生ずるクローンをそれぞれFVII (2463)/pDX、及びFVII (565+2463)/pDXと命名した。E. コリJM83に形質転換し、次に制限酵素分析により同定した後、プラスミドDNAの調製を行い、広範囲の制限エンドヌクレアーゼ消化によってチェックした。プラスミドFVII (2463)/pDX、及びFVII (565+2463)/pDXはアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託され、それぞれ受託番号 No. 40206、及び No. 40205が与えられた。

【0180】FVII (2463)/pDX及びFVII (565+2463)/pDX (10μgずつ)のそれぞれを、10μgのサケ精子キャリアーDNAと共に、BHK tk- t13細胞(Floros等、Exper. Cell Res. 132:215-223, 1981)又はCOS細胞のいずれかに、標準的リン酸カルシウム沈澱法を用いてトランスフェクトした。トランスフェクションに続き、細胞を5μg/

mlのビタミンKを含有する適当な培地に2日間培養した。この時点で、ファクターVIIに対するモノクローナル抗体を用いて、上清をELISA陽性材料についてアッセイした。FVII (2463)/pDX及びFVII (565+2463)/pDXの両者はファクターVIIポリペプチドの生産を指令し、これはCOS細胞上清中に検出され、そしてFVII (565+2463) pDX*

*からのファクターVIIはBHK細胞上清中に観察された。Sham-トランスフェクトされたBHK細胞又はCOS細胞は検出可能なレベルのファクターVIIをもたらしなかった(表6)。

【0181】

【表6】

DNA	細胞系	細胞数	ELISA 陽性物質 (ng/ml 培地)
FVII(2463)/pDX	COS	2×10^6	15
FVII(565+2463)/pDX	COS	2×10^6	12
対 照	COS	2×10^6	<2
FVII(2463)/pDX	BHK	9×10^6	62
FVII(565+2463)/pDX	BHK	9×10^6	6
対 照	BHK	9×10^6	<2

【0182】ファクターVIIの一時的な発現も表7に挙

※

【0183】

げる幾つかの他の細胞系において試験した。

【表7】

名 称	説 明	参 照 (ATCC 号)
1. Rat Hep I	ラット肝癌 H4-II-E -C3	CRL 1600
2. Rat Hep II	ラット肝癌 H4-II-E	CRL 1548
3. TCMK	SV40 ウイルスで形質 転換されたマウス腎 TCMK-1	CCL 139
4. ヒト肺	SV40 ウイルスで形質 転換された WI-38 VA13, サブライン 2RA	CCL 75.1
5. ヒト肝癌	ヒト肝腺癌 SK-HEP-1	HTB-52
6. Hep G2	ヒト肝癌 (Barbara Knowles/Wistar Institute)	HTB 8065
7. マウス肝	NCTC クローン 1469	CC 29.1
8. COS	SV40-形質転換 CV-1 (サル)細胞	CRL 1650
9. BHK	幼ハムスター腎 BHK-21(C-13)	CCL 10
10. 293	ヒト胎児腎/Ad形質転 換	CRL 1573
11. DUKX	CHO-DHFR ^{sens}	(Urlaub & Chasin, PNAS (USA) 77:4216- 4220, 1980)

【0184】細胞を、10μgのFVII (2463)/pDX又はFVII (565+2463)/pDXのいずれ★50 ★れか、並びにクロラムフェニコールアセチルトランスフ
エラーゼ遺伝子を含んで成るプラスミド1μg (同時ト

ランスフェクトされた細胞の同定を可能にするため) 及び *した。結果を表8及び表9に示す。
 び10 μ gのサケ精子DNAにより同時トランスフェク 【0185】
 トした。6日後にスペント培地をELISAにより測定* 【表8】

サンプル	細胞系	プラスミド	細胞数 ($\times 10^{-6}$)	ELISA (ng/ μ l)
1.	Rat Hep 1	Mock	11.6	2.4
2.	Rat Hep 1	FVII(565+2463)/pDX	7.0	2
3.	Rat Hep 1	FVII(2463)/pDX	7.0	<2
4.	Rat Hep 2	Mock	13.0	<2
5.	Rat Hep 2	FVII(565+2463)/pDX	18.4	<2
6.	Rat Hep 2	FVII(2463)/pDX	14.6	<2
7.	TCMK	Mock	18.8	<2
8.	TCMK	FVII(565+2463)/pDX	9.8	<2
9.	TCMK	FVII(2463)/pDX	12.8	<2
10.	ヒト肺	Mock	7.2	<2
11.	ヒト肺	FVII(565+2463)/pDX	3.4	16.5
12.	ヒト肺	FVII(2463)/pDX	3.4	12.2
13.	ヒト肝癌	Mock	13.0	<2
14.	ヒト肝癌	FVII(565+2463)/pDX	11.0	3.5
15.	ヒト肝癌	FVII(2463)/pDX	6.0	3.0
16.	HepG2	Mock	6.8	21

【0186】

※ ※【表9】

17.	HepG2	FVII(565+2463)/pDX	6.0	45.5
18.	HepG2	FVII(2463)/pDX	6.0	28
19.	マウス肝	Mock	3.8	<2
20.	マウス肝	FVII(565+2463)/pDX	4.0	<2
21.	マウス肝	FVII(2463)/pDX	3.6	<2
22.	COS	Mock	5.6	<2
23.	COS	FVII(565+2463)/pDX	5.6	15.5
24.	COS	FVII(2463)/pDX	4.4	14.5
25.	BHK tk ⁻ t13	Mock	3.0	<2
26.	BHK tk ⁻ t13	FVII(565+2463)/pDX	5.0	25
27.	BHK tk ⁻ t13	FVII(2463)/pDX	4.0	22.5
28.	293	Mock	5.8	<2
29.	293	FVII(565+2463)/pDX	6.2	94
30.	293	FVII(2463)/pDX	8.2	100
31.	DUKX	Mock	11.6	<2
32.	DUKX	FVII(565+2463)/pDX	13.0	<2
33.	DUKX	FVII(2463)/pDX	13.6	<2

【0187】FVII(2463)/pDX(10 μ g)
 又はFVII(565+2463)/pDX(10 μ g)
 を、10 μ gのサケ精子DNA及び哺乳類発現ベクター
 中ジヒドロフォレートリダクターゼの耐性形(Simonson
 及びLevinson, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 80:2495-24
 99, 1983)をコードするプラスミド1 μ gと共にBHK
 tk⁻t13細胞に同時トランスフェクトした。2日
 後、細胞を1:14に分け、250nM又は1000nMメ
 トトレキセート(MTX)、及び5 μ g/mlのビタミン

☆K(フェタジオン、メルク)を含有する選択培地に入れ
 た。2週間後、コロニーを単離し、そして50~90%
 コンフルエンスに増殖させた。次に上清をELISA
 によりファクターVII ポリペプチドについて測定した。
 【0188】25個の陽性クローンの内22個をさらに
 分析した。細胞を、5 $\times 10^4$ (グループI)又は1 \times
 10⁵(グループII)で、5 μ g/mlのビタミンK、及
 び250nM又は1000nMメトトレキセートを含有する
 10cmの皿にプレートした。5日後、速く増殖するクロ

ーン(表10及び11中*印を付す)を1:2に分け、
そして25時間後すべてのプレート上の培地を交換し
た。23時間後(グループI)又は20時間後(グルー
プII)、上清を収得し、そして各クローンについて細胞*

*を計数した。培地をELISA又はワンステージクロ
ッピングアッセイの両方により測定した。

【0189】

【表10】

グループI - 23 時間後の測定

クローン	プラスミド	細胞数 ($\times 10^{-5}$)	ELISA (pg/細胞 /日)	ELISA (ng/ml)	クロッ ピング (ng/ml)	活 性 %
B4-A1*	FVII(565+2463)/pDX	2	6.5	130	206	158
B4-B1*	FVII(565+2463)/pDX	27	1.9	513	360	70
B4-C1	FVII(565+2463)/pDX	16	2.5	393	480	122
B4-C2*	FVII(565+2463)/pDX	9	<0.2	<20	21	-
B4-C3	FVII(565+2463)/pDX	52	1.5	800	910	114
B4-D1*	FVII(565+2463)/pDX	27	2.0	553	570	103
B4-D2*	FVII(565+2463)/pDX	13	1.2	150	154	103
B4-E1	FVII(565+2463)/pDX	39	2.2	870	1160	133
B4-E2*	FVII(565+2463)/pDX	8	2.5	205	240	117

【0190】

※ ※【表11】

B4-E3	FVII(565+2463)/pDX	23	1.2	275	320	116
B4-E4	FVII(565+2463)/pDX	31	1.3	410	300	73
B3-53*	FVII(2463)/pDX	5	8.2	410	290	70
B3-22	FVII(2463)/pDX	41	2.5	1043	500	48
B3-23	FVII(2463)/pDX	19	3.0	580	610	105
B3-32	FVII(2463)/pDX	13	1.5	197	216	110
B3-4.2	FVII(2463)/pDX	41	1.8	760	620	82
B3-5.1	FVII(2463)/pDX	14	3.3	460	400	87
B3-5.2	FVII(2463)/pDX	9	2.7	257	184	72
B6-D	FVII(2463)/pDX	54	3.0	1700	780	46
B6-E	FVII(2463)/pDX	101	1.6	1640	970	59
B6-G	FVII(2463)/pDX	31	5.7	1853	1080	58
B6-M	FVII(2463)/pDX	75	2.2	1743	940	54

【0191】B. ファクターVII ゲノム-cDNAハイ
ブリドの発現

ファクターVII ゲノム5'-末端を代表するゲノム配列
及びファクターVII 遺伝子3'-末端からのcDNA配
列を含んでなる発現ベクターを次のようにして調製し
た。ゲノムプラスミド7mlの3つのサブクローン、7B
am、7SD及び7SEを用いて5'-末端を再構成し
た。プラスミド7BamはpUC12にサブクローニン
グされた、エクソン1aを含有する3.6kb EcoR★50

★I-BamHI断片である。エクソン1aを含有する
0.7kb EcoRI-XbaI断片をこのサブクロー
ンから単離した。これを断片aと称する。プラスミド7
SDは、pUC18にサブクローニングされた、エクソ
ン1bを含有する3.7kb SstI断片である。

【0192】エクソン1b含有3.1kb XbaI-S
stI断片をこのサブクローンから単離した。これを断
片bと称する。プラスミド7SEは、M13mp19に
サブクローニングされた、エクソン2-4を含有する

3. 9kb Sst I断片である。エクソン2の5' 部分を含有するSst I-Bgl II (0.6kb)断片をゲル単離した。これを断片cと称する。3'-ファクターVII cDNAの残り(断片d)はpUVII 2463から2kb Bgl II-EcoRI断片として得た。断片a-dを、EcoRIで開裂されそしてウシ小腸ホスファターゼ処理されたpDXと連結し、そしてE. コリJM83又はHB101に形質転換した。陽性コロニーを制限酵素分析により同定し、そしてこれらのコロニーからプラスミドDNAを調製した。

【0193】ファクターVIIの発現のため、プラスミドDNAを前記のようにしてBHK又はCOSに同時トランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞をビタミンK-含有培地中で2日間培養し、培地をELISAによりファクターVIIについて測定した。以上、この発明を具体的に説明したが、この発明の範囲内において多くの変更を行うことが可能である。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、cDNAクローンλVII 2115及びλVII 1923の部分とを連結することにより形成された部分的ファクターVII cDNA配列を示す。

【図2】図2は、cDNAクローンλVII 2115及びλVII 1923の部分とを連結することにより形成された部分的ファクターVII cDNA配列を示す。

【図3】図3は、cDNAクローンλVII 2115及びλVII 1923の部分とを連結することにより形成された部分的ファクターVII cDNA配列を示す。

【図4】図4はλVII 2463のファクターVII cDNA配列を示す。矢印はλVII 565の配列中の欠失の範囲を示す。配列の上方の番号はアミノ酸を示し、下方の番号はヌクレオチドを示す。

【図5】図5はλVII 2463のファクターVII cDNA配列を示す。

【図6】図6はλVII 2463のファクターVII cDNA配列を示す。

【図7】図7はλVII 2463のファクターVII cDNA配列を示す。

【図8】図8は、幾つかの凝固因子のアミノ末端領域のアミノ酸配列を示す。

【図9】図9は、蛋白質配列決定から得られたファクターVIIのアミノ酸配列とcDNAによりコードされているそれとの比較を示す。

【図10】図10はファクターIXリーダー配列とコンセンサスカルシウム結合ドメインとの連結を示す。

【図11】図11はファクターIX-コンセンサス配列ハイブリッドと部分的ファクターVII cDNAとの連結によるインフレーム(in-frame)コード配列の形成を示す。

【図12】図12はファクターIX/ファクターVII 融合蛋白質をコードする配列を含有するプラスミドの造成を示す。

【図13】図13は発現ベクターFIX/VII /pD2を示す。使用されている記号は、Ad2 MLPはアデノウイルス2からの主要後期(major late)プロモーターであり；L1-3はアデノウイルス2トリパルタイト(tripartite)リーダー配列であり；5' ssは5' スプライス部位であり；3' ssは3' スプライス部位であり；そしてpAはSV40からの後期ポリアデニレーションシグナルである。

【図14】図14はファクターIX/ファクターVII cDNA融合体のヌクレオチド配列を示す。

【図15】図15はファクターIX/ファクターVII cDNA融合体のヌクレオチド配列を示す。

【図16】図16はファクターIX/ファクターVII cDNA融合体のヌクレオチド配列を示す。

【図17】図17はファクターIX/ファクターVII cDNA融合体のヌクレオチド配列を示す。

【図18】図18は発現ベクターpM7135を示す。使用されている記号は、EはSV40エンハンサーであり；oriはO-1マップユニットAd5であり；pAはSV40からの前記ポリアデニレーションシグナルであり；ΔはpBR322“毒性(poison)”配列の欠失領域であり；そして他の記号は第6図に記載した通りである。

【図19】図19は2463bpのファクターVII cDNAのサブクローニングを示す。

【図20】図20は565bpのファクターVII cDNAのサブクローニングを示す。

【図21】図21はpVII 565の5' 末端とpUC18中のpVII 2463の3' 末端との連結によるpVII 2397の形成を示す。

【図22】図22は発現プラスミドFVII (2463)/pDX及びFVII (565+2463)/pDXの造成を示す。pAは、例9に示すように、前期又は後期方向におけるSV43からのポリアデニレーションシグナルを示す。他の記号は図18について記載したのと同じである。

【図1】

EcoRIa 24 39 54
 GAATTCGG TGC AGG ACG AAG CTG TTC TGG ATT TCT TAC AGT GAT GGG GAC CAG
 Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln

69 84 99
 TGT GCC TCA AGT CCA TGC CAG AAT GGG GGC TCC TGC AAG GAC CAG CTC CAG TCC
 Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser

114 129 144 159
 TAT ATC TGC TTC TGC CTC CCT GCC TTC GAG GGC CGG AAC TGT GAG ACG CAC AAG
 Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys

174 189 204 Pst Ia
 GAT GAC CAG CTG ATC TGT GTG AAC GAG AAC GGC GGC TGT GAG CAG TAC TGC AGT
 Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser

219 234 249 264
 GAC CAC ACG GGC ACC AAG CGC TCC TGT CGG TGC CAC GAG GGG TAC TCT CTG CTG
 Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu

279 294 309 324
 GCA GAC GGG GTG TCC TGC ACA CCC ACA GTT GAA TAT CCA TGT GGA AAA ATA CCT
 Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro

Xba I 339 354 369
 ATT CTA GAA AAA AGA AAT GCC AGC AAA CCC CAA GGC CGA ATT GTG GGG GGC AAG
 Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys

384 399 414 429
 GTG TGC CCC AAA GGG GAG TGT CCA TGG CAG GTC CTG TTG TTG GTG AAT GGA GCT
 Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala

444 459 474
 CAG TTG TGT GGG GGG ACC CTG ATC AAC ACC ATC TGG GTG GTC TCC GCG GCC CAC
 Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His

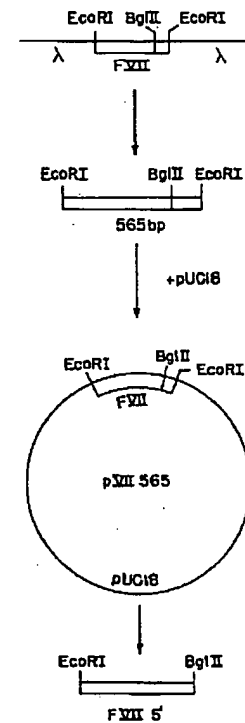
489 504 519 534
 TGT TTC GAC AAA ATC AAG AAC TGG AGG AAC CTG ATC GCG GTG CTG GGC GAG CAC
 Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His

549 564 579 594
 GAC CTC AGC GAG CAC GAC GGG GAT GAG CAG AGC CGG CGG GTG GCG CAG GTC ATC
 Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile

609 Sma I 624 639
 ATC CCC AGC ACG TAC GTC CCG GGC ACC ACC AAC CAC GAC ATC GCG CTG CTC CGC
 Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg

654 669 684 699
 CTG CAC CAG CCC GTG GTC CTC ACT GAC CAT GTG GTG CCC CTC TGC CTG CCC GAA
 Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu

【図20】



【図7】

CCCAGCTTCACAATAAACGGCTGCGTCTCCTCCGCACACCTGTGGTGCCTGCCACCCAAA
 2410 2420 2430 2440 2450 2460

AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 2470 2480

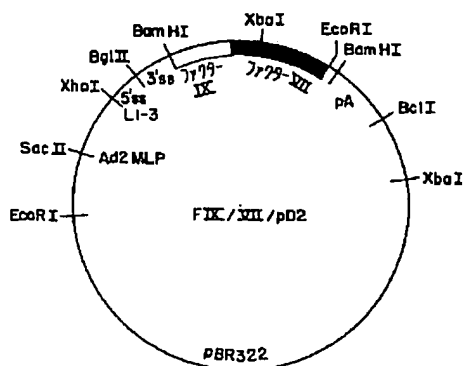
【図2】

CGG ACC TTC	714	729	744
Arg Thr Phe	Ser Glu Arg	Thr Leu Ala	Phe Val Arg
CGG ACC TTC	759	774	789
Arg Thr Phe	Ser Glu Arg	Thr Leu Ala	Phe Val Arg
CGG ACC TTC	819	834	849
Arg Thr Phe	Ser Glu Arg	Thr Leu Ala	Phe Val Arg
CGG ACC TTC	879	894	909
Arg Thr Phe	Ser Glu Arg	Thr Leu Ala	Phe Val Arg
CGG ACC TTC	924	939	954
Arg Thr Phe	Ser Glu Arg	Thr Leu Ala	Phe Val Arg
CGG ACC TTC	984	999	1014
Arg Thr Phe	Ser Glu Arg	Thr Leu Ala	Phe Val Arg
CGG ACC TTC	1029	1044	1059
Arg Thr Phe	Ser Glu Arg	Thr Leu Ala	Phe Val Arg
CGG ACC TTC	1089	1104	1119
Arg Thr Phe	Ser Glu Arg	Thr Leu Ala	Phe Val Arg
CGG ACC TTC	1148	1158	1168
Arg Thr Phe	Ser Glu Arg	Thr Leu Ala	Phe Val Arg
CGG ACC TTC	1178	1188	1198
Arg Thr Phe	Ser Glu Arg	Thr Leu Ala	Phe Val Arg
CGG ACC TTC	1218	1228	1238
Arg Thr Phe	Ser Glu Arg	Thr Leu Ala	Phe Val Arg
CGG ACC TTC	1248	1258	1268
Arg Thr Phe	Ser Glu Arg	Thr Leu Ala	Phe Val Arg
CGG ACC TTC	1278	1288	1298
Arg Thr Phe	Ser Glu Arg	Thr Leu Ala	Phe Val Arg
CGG ACC TTC	1308	1318	1328
Arg Thr Phe	Ser Glu Arg	Thr Leu Ala	Phe Val Arg
CGG ACC TTC	1338	1348	1358
Arg Thr Phe	Ser Glu Arg	Thr Leu Ala	Phe Val Arg
CGG ACC TTC	1368	1378	1388
Arg Thr Phe	Ser Glu Arg	Thr Leu Ala	Phe Val Arg
CGG ACC TTC	1398	1408	1418
Arg Thr Phe	Ser Glu Arg	Thr Leu Ala	Phe Val Arg
CGG ACC TTC	1428	1438	1448
Arg Thr Phe	Ser Glu Arg	Thr Leu Ala	Phe Val Arg
CGG ACC TTC	1458	1468	1478
Arg Thr Phe	Ser Glu Arg	Thr Leu Ala	Phe Val Arg
CGG ACC TTC	1488		
Arg Thr Phe	Ser Glu Arg	Thr Leu Ala	Phe Val Arg

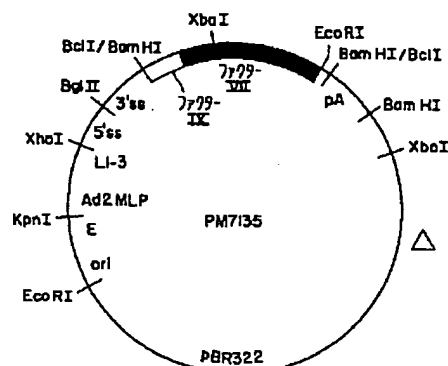
【図3】

1498	1508	1518	1528	1538	1548	1558
CAGCCAAGCC	CCACCTGCAC	GTGATCTGCT	GGCCCTCAGG	CTGCTGCTCT	GCCTTCATTG	CTGGACACAG
1568	1578	1588	1598	1608	1618	1628
TAGAGGCATG	ACACACATGG	ATGCACACAC	ACACACGCCA	TGCACACACA	CAGAGATATG	CACACACACG
1638	1648	1658	1668	1678	1688	1698
GATGCACACA	CAGATGGTCA	CACAGAGTAC	GCAACACAC	CGATGCACAC	GCACATAGAG	ATATGCACAC
1708	1718	1728	1738	1748	1758	1768
ACAGATGCAC	ACACAGATAT	ACACATGGAG	TGCACGCACA	TGCCAATGCA	CGCACACATC	AGTGCACACG
1778	1788	1798	1808	1818	1828	1838
GATGCACAGA	GATATGCACA	CACCGATGTG	CGCACACACA	GATATGCACA	CACATGGATG	AGCACACACA
1848	1858	1868	1878	1888	1898	1908
CACCAAGTGC	GCACACACAC	CGATGTACAC	ACAGATGCAC	ACACAGATGC	ACACACACCG	ATGCTEACTC
1918	1928	1938	1948	1958	1968	1978
CATGTGTGCT	GTCTCTCAA	GGCGTTGTT	TAGCTCTCAC	TTTTCTGGTT	CTTATCCATT	ATCATCTTCA
1988	1998	2008	2018	2028	2038	2048
CTTCAGACAA	TTCAGAAGCA	TCACCATGCA	TGGTGGCGAA	TGCCCCCAAA	CTCTCCCCCA	AATGTATTTC
2058	2068	2078	2088	2098	2108	2118
TCCCTTCGCT	GGGTGCCGGG	CTGCACAGAC	TATTCCCCAC	CTGTTCCCCA	GCTTCACAAT	AAACGCTGCG
2128	2138	2148	2158	2168	EcoRIb	
GTCTCTCTCG	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAGGAATTC	

【図13】



【図18】



【図4】

```

                                -60
                                MetValSerGlnAlaLeuArgLeuLeu
TCAACAGGCAGGGGCAGCACTGCAGAGATTTCATCATGGTCTCCCAGGCCCTCAGGCTCCTC
   10         20         30         40         50         60

-50                                -40 ↓
CysLeuLeuLeuGlyLeuGlnGlyCysLeuAlaAlaGlyGlyValAlaLysAlaSerGlyGly
TGCCTTCTGCTTGGGCTTCAGGGCTGCCTGGCTGCAGGCGGGGTGCTAAGGCCTCAGGAGGA
   70         80         90        100        110        120

-30                                -20 ↓
GluThrArgAspMetProTrpLysProGlyProHisArgValPheValThrGlnGluGlu
GAAACACGGGACATGCCGTGGAAGCCGGGCCTCACAGAGTCTTCGTAACCCAGGAGGAA
  130        140        150        160        170        180

-10                                -1 +1                                +10
AlaHisGlyValLeuHisArgArgArgAlaAsnAlaPheLeuGluGluLeuArgPro
GCCCACGGCGTCCTGCACCGGCGCCGGCGGCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGCCG
  190        200        210        220        230        240

                                +20                                +30
GlySerLeuGluArgGluCysLysGluGluGlnCysSerPheGluGluAlaArgGluIle
GGCTCCCTGGAGAGGGAGTGCAAGGAGGAGCAGTGCTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATC
  250        260        270        280        290        300

                                +40                                +50
PheLysAspAlaGluArgThrLysLeuPheTrpIleSerTyrSerAspGlyAspGlnCys
TTCAAGGACGCGGAGAGGACGAAGCTGTTCTGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCACTGT
  310        320        330        340        350        360

                                +60                                +70
AlaSerSerProCysGlnAsnGlyGlySerCysLysAspGlnLeuGlnSerTyrIleCys
GCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCTCCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCTATATCTGC
  370        380        390        400        410        420

                                +80                                +90
PheCysLeuProAlaPheGluGlyArgAsnCysGluThrHisLysAspAspGlnLeuIle
TTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGAAGTGTGAGACGCACAAGGATGACCAGCTGATC
  430        440        450        460        470        480

                                +100                                +110
CysValAsnGluAsnGlyGlyCysGluGlnTyrCysSerAspHisThrGlyThrLysArg
TGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAGCAGTACTGCAGTGACCACACGGGCACCAAGCGC
  490        500        510        520        530        540

                                +120                                +130
SerCysArgCysHisGluGlyTyrSerLeuLeuAlaAspGlyValSerCysThrProThr
TCCTGTCGGTGCCACGAGGGGTACTCTGCTGGCAGACGGGGTGTCTGCACACCCACA
  550        560        570        580        590        600

                                +140                                +150
ValGluTyrProCysGlyLysIleProIleLeuGluLysArgAsnAlaSerLysProGln
GTTGAATATCCATGTGGAATAATACCTATTCTAGAAAAAGAAATGCCAGCAAACCCCAA
  610        620        630        640        650        660

```

【図5】

						+160							+170
GlyArgIleValGlyGlyLysValCysProLysGlyGluCysProTrpGlnValLeuLeu							GGCCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGTGCCCCAAAGGGGAGTGTCCATGGCAGGTCCTGTTG						
670	680	690	700	710	720								
						+180							+190
LeuValAsnGlyAlaGlnLeuCysGlyGlyThrLeuIleAsnThrIleTrpValValSer							TTGGTGAATGGAGCTCAGTTGTCTGGGGGGACCCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCC						
730	740	750	760	770	780								
						+200							+210
AlaAlaHisCysPheAspLysIleLysAsnTrpArgAsnLeuIleAlaValLeuGlyGlu							GCGGCCCCACTGTTTCGACAAAATCAAGAACTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTGGGCGAG						
790	800	810	820	830	840								
						+220							+230
HisAspLeuSerGluHisAspGlyAspGluGlnSerArgArgValAlaGlnValIleIle							CAGACCTCAGCGAGCAGGAGGATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTCATCATC						
850	860	870	880	890	900								
						+240							+250
ProSerThrTyrValProGlyThrThrAsnHisAspIleAlaLeuLeuArgLeuHisGln							CCCAGCACGTACGTCCCGGGCACCACCAACCACGACATCGCGCTGCTCCGCCTGCACCAG						
910	920	930	940	950	960								
						+260							+270
ProValValLeuThrAspHisValValProLeuCysLeuProGluArgThrPheSerGlu							CCCGTGGTCCTCACTGACCATGTGGTGGCCCTCTGCCTGCCCCAACGGACGTTCTCTGAG						
970	980	990	1000	1010	1020								
						+280							+290
ArgThrLeuAlaPheValArgPheSerLeuValSerGlyTrpGlyGlnLeuLeuAspArg							AGGACGCTGGCCTTCGTGCGCTTCTCATTTGGTCAGCGCTGGGGCCAGCTGCTGGACCGT						
1030	1040	1050	1060	1070	1080								
						+300							+310
GlyAlaThrAlaLeuGluLeuMetValLeuAsnValProArgLeuMetThrGlnAspCys							GGCGCCACGGCCCTGGAGCTCATGGTCTCAACGTGCCCCGGCTGATGACCCAGGACTGC						
1090	1100	1110	1120	1130	1140								
						+320							+330
LeuGlnGlnSerArgLysValGlyAspSerProAsnIleThrGluTyrMetPheCysAla							CTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGGAGACTCCCCAAATATCACGGAGTACATGTTCTGTGCC						
1150	1160	1170	1180	1190	1200								
						+340							+350
GlyTyrSerAspGlySerLysAspSerCysLysGlyAspSerGlyGlyProHisAlaThr							GGCTACTCGGATGGCAGCAAGGACTCTGCAAGGGGGACAGTGGAGGCCACATGCCACC						
1210	1220	1230	1240	1250	1260								
						+360							+370
HisTyrArgGlyThrTrpTyrLeuThrGlyIleValSerTrpGlyGlnGlyCysAlaThr							CACTACCGGGGCACGTGGTACCTGACGGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCAACC						
1270	1280	1290	1300	1310	1320								

【図6】

						+380							+390						
Val	Gly	His	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile	Glu	Trp	Leu	Gln	Lys	Leu
GTGGGCCACTTTGGGGTGTACACCAGGGTCTCCCAGTACATCGAGTGGCTGCAAAAGCTC																			
1330	1340	1350	1360	1370	1380														
						+400							+406						
Met	Arg	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu	Leu	Arg	Ala	Pro	Phe	Pro	***			
ATGCGCTCAGAGCCACGCCAGGAGTCCTCCTGCGAGCCCCATTTCCCTAGCCCAGCAGC																			
1390	1400	1410	1420	1430	1440														
CCTGGCCTGTGGAGAGAAAGCCAAGGCTGCGTCAACTGTCTGGCACCAAATCCCATAT																			
1450	1460	1470	1480	1490	1500														
ATTCTTCTGCAGTTAATGGGGTAGAGGAGGGCATGGGAGGGAGGGAGAGGTGGGGAGGGA																			
1510	1520	1530	1540	1550	1560														
GACAGAGACAGAAACAGAGAGACAGAGACAGAGAGAGACTGAGGGAGAGACTCTGAGG																			
1570	1580	1590	1600	1610	1620														
ACATGGAGAGAGACTCAAAGAGACTCCAAGATTCAAAGAGACTAATAGAGACACAGAGAT																			
1630	1640	1650	1660	1670	1680														
GGAATAGAAAAGATGACAGGCAGAGGCAGACAGGCGCTGGACAGAGGGGCAGGGGAGTGC																			
1690	1700	1710	1720	1730	1740														
CAAGGTTGTCTGGAGGCAGACAGCCCAGCTGAGCCTCCTTACCTCCCTTCAGCCAAGCC																			
1750	1760	1770	1780	1790	1800														
CCACCTGCACGTGATCTGCTGGCCCTCAGGCTGCTGCTCTGCCTTCATTGCTGGAGACAG																			
1810	1820	1830	1840	1850	1860														
TAGAGGCATGAACACACATGGATGCACACACACACACGCCAATGCACACACACAGAGATA																			
1870	1880	1890	1900	1910	1920														
TGCACACACACGGATGCACACACAGATGGTCACACAGAGATACGCAAACACACCGATGCA																			
1930	1940	1950	1960	1970	1980														
CACGCACATAGAGATATGCACACACAGATGCACACACAGATATACACATGGATGCACGCA																			
1990	2000	2010	2020	2030	2040														
CATGCCAATGCACGCACACATCAGTGCACACGGATGCACAGAGATATGCACACACCGATG																			
2050	2060	2070	2080	2090	2100														
TGCGCACACACAGATATGCACACACATGGATGAGCACACACACACCAAGTGCGCACACAC																			
2110	2120	2130	2140	2150	2160														
ACCGATGTACACACACAGATGCACACACAGATGCACACACACCGATGCTGACTCCATGTG																			
2170	2180	2190	2200	2210	2220														
TGCTGTCTCTGAAGGCGGTTGTTTAGCTCTCACTTTTCTGGTTCATTATCCATTATCATC																			
2230	2240	2250	2260	2270	2280														
TTCACCTCAGACAATTGAGAAGCATCACCATGCATGGTGGCGAATGCCCCAAACTCTCC																			
2290	2300	2310	2320	2330	2340														
CCCAAATGTATTTCTCCCTTCGCTGGGTGCCGGGCTGCACAGACTATTCCCCACCTGCTT																			
2350	2360	2370	2380	2390	2400														

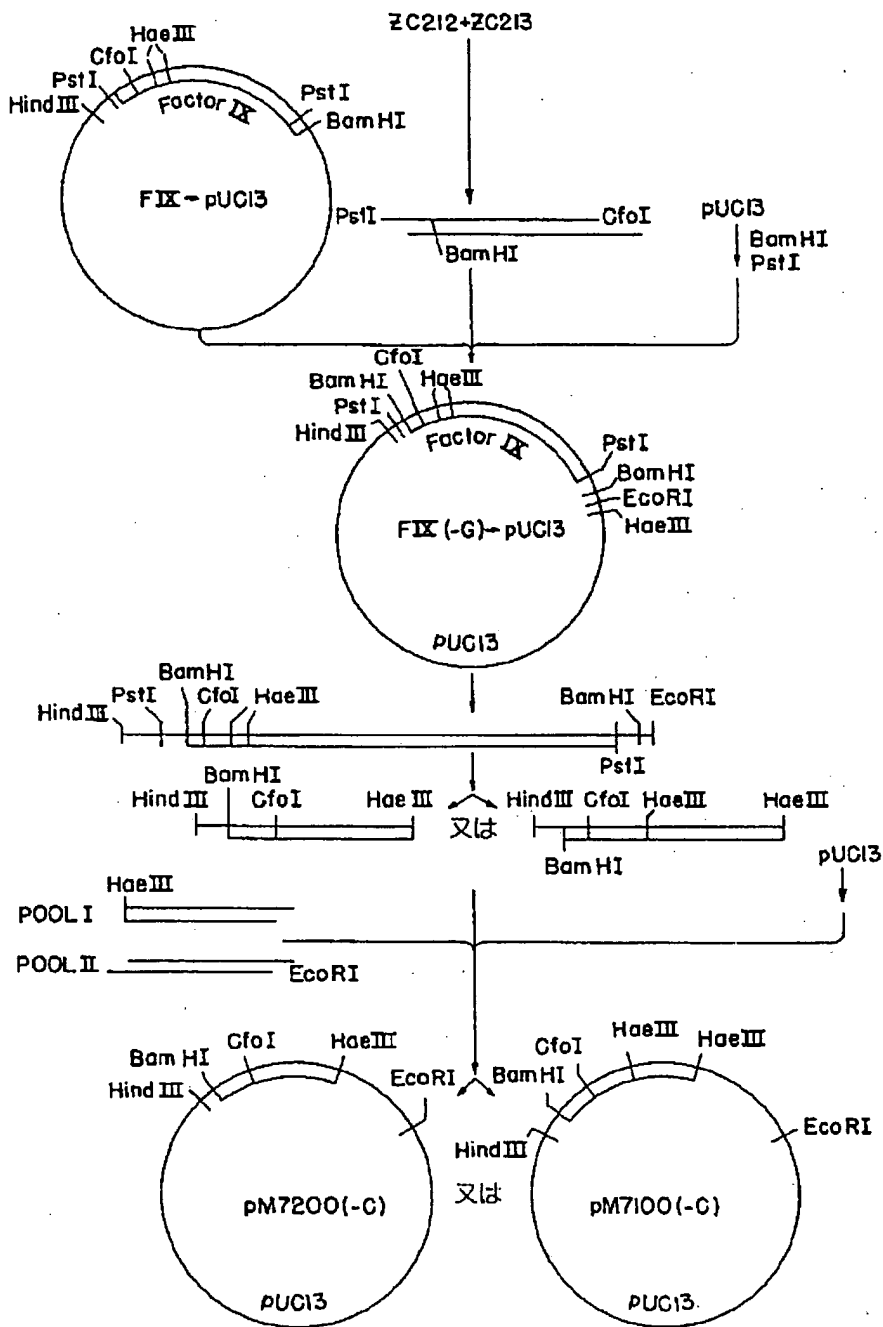
【図8】

	1	10	20	30	40
ファクターVII	ANA-FLYYLRPGSLYRYCKYYQCSFY YARYIFYXXXITKL				
ファクターIX	YNSGKLYYFVQCENLYRYCHYYKCSFY YARYVIFYNTYRTTY				
ファクターX	ANS-FLYYHKKCHLYRYCHYYTCSTYYARYVIFYDSDKITRY				
プロテインC	ANS-FLYYLRHSSLYRYCIYYICDFYYALYIFQNVDDTLA				
プロスロンピン	ANT-FLYYVRKCNLYRYCVYYTCSTYYAFYALYSSTATDV				
	50	60	70		
ファクターVII	FWISYSDGDQCASS-----PCQNGGSCKDQLQSTICYF				
ファクターIX	FWKQYVDGDQCESN-----PCLNGGSCKBDINSYECW				
ファクターX	FWNKYKDGDCQETS-----PCQNGGCKCKBCLCEYTCF				
プロテインC	FWSKHVDGDQCLVLPLEHPCASLCCCHCTCIBGICSFSCD				
プロスロンピン	FWAKYTACETARTPRDKLAACLECNCAEGLGTNYRGHVI				
	80	90	100	110	
ファクターVII	CLPAFEGRNCTHKDDQLICVNEENGCGCEQYCS DHTGTKRSC				
ファクターIX	CPFGFEGKNCELDVT----CNIXNGRCEQFCKNSADNXVVC				
ファクターX	CLEGFEGKNCELFTRKL--CSLDNMGDCDQFCHEEQNS-VVC				
プロテインC	CRSGWECRFQCREVSFLN-CSLDNMGCTHYCLEEVGW-RRR				
プロスロンピン	TRSGIECQLWRSRYPHKP-EINSTTRPGADLQENFCRNPD				
	120	130	140		
ファクターVII	KCHEGYSLLADGVSCPTVETYPGCKIPILEKRNASKPQGR				
ファクターIX	SCTEGYRLAGNQKSCEPAVFPFCGRVSVSQTSLRT				
ファクターX	SCARGYTLADNGKACIPTGPFYPCGKQTLER				
プロテインC	SCAPGYKLCDDLLQCHPAVKFPFCGRPWKRMEKKRSRL				
プロスロンピン	SNIGPWCTTDTPTVRRQECSIPVCCQDQVTVANTPRS				

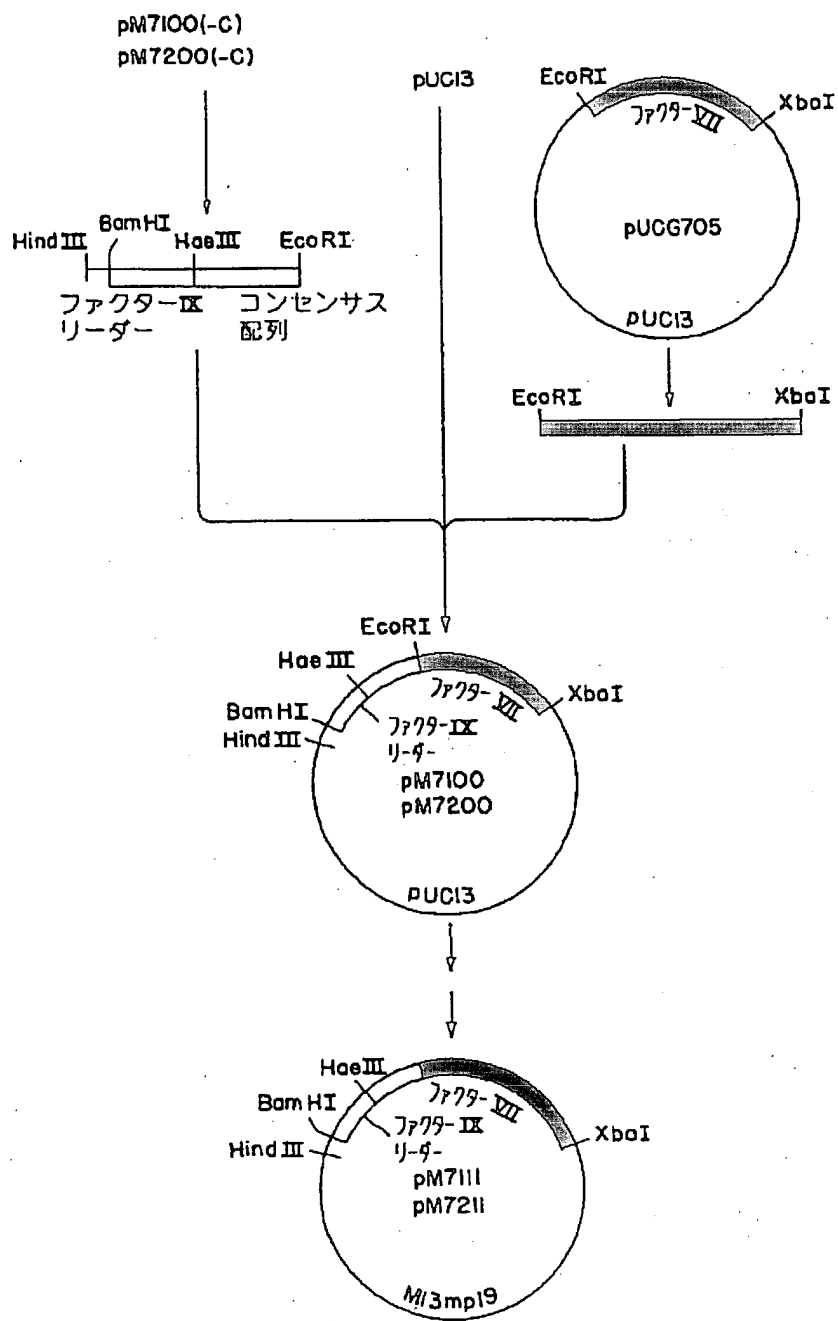
【図9】

cDNAから アミノ酸配列	1	10	20	30	36
	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
	**	*	*	*	*
	ANAFLYYLRPGSLYRYCKY	YQCSEFY	YARYIF	YXXXXXX	
cDNAから アミノ酸配列	40	50	60	70	
	KLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSCCKDQLQSYICFCL				
	LFWISYSDGDQCASSPCQNGGSCCKDQLQ				ICFCL
cDNAから アミノ酸配列	80	90	100		
	PAFEGRNCETHKDDQLICVNEGCGCEQYCSDHIGTK				
	PAFEGRNCETHKDDQL				CSDHIGT
cDNAから アミノ酸配列	110	120	130	140	
	RSCRCHEGYSLADCVSCTPTVEYPCGKIPILEKRW				
	SCRCHEGYSLADCVSCTPTVEY				EKR()
cDNAから アミノ酸配列	150				
	ASKPQGR				
	ASKPQGR				

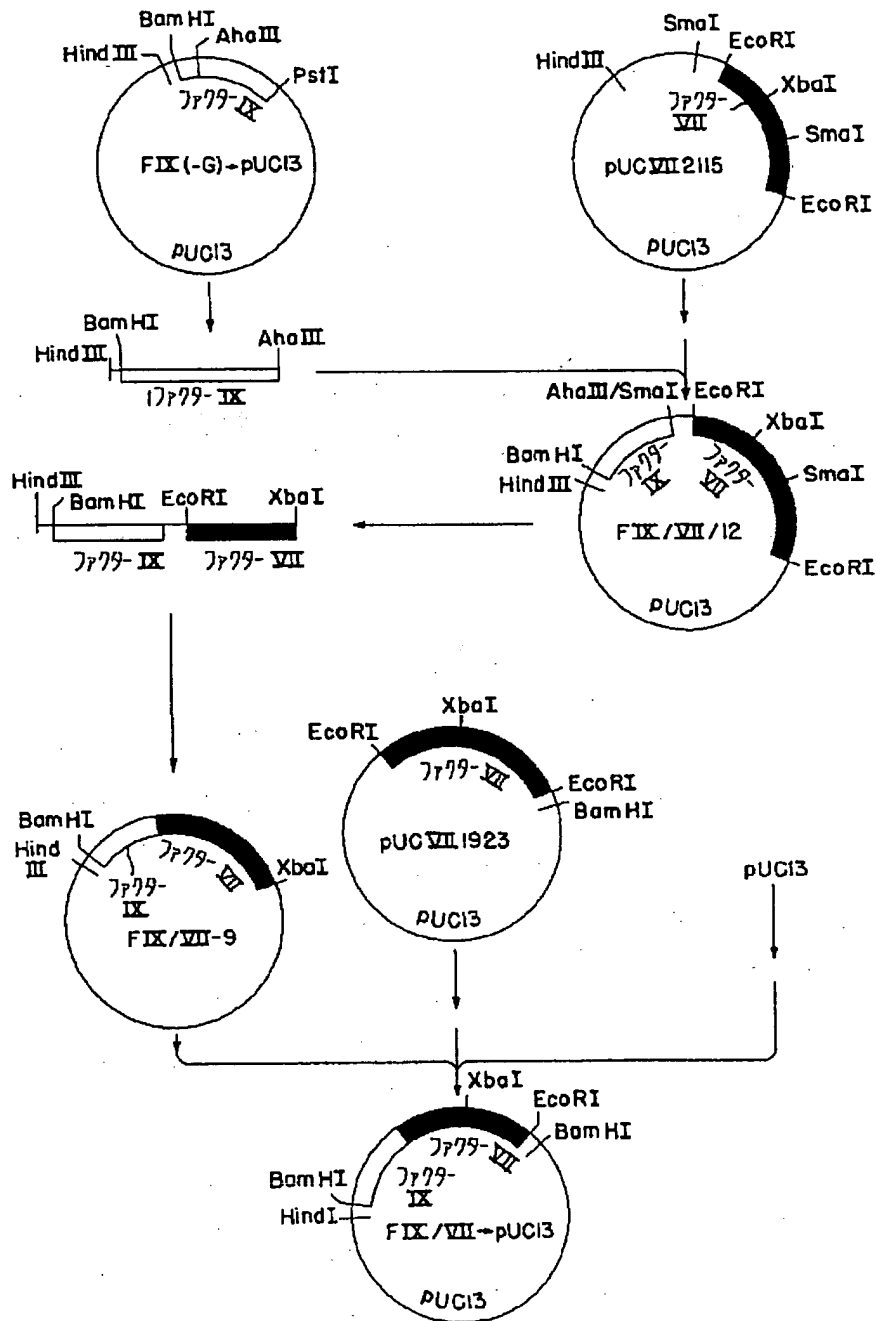
【図10】



【図11】



【図12】



[illegible]

【図15】

636	651	666
GGG GAG TGT CCA TGG CAG GTC CTG TTG TTG GTG AAT GGA GCT CAG		
Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln		
681	696	711
TTG TGT GGG GGG ACC CTG ATC AAC ACC ATC TGG GTG GTC TCC GCG		
Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala		
726	741	756
GCC CAC TGT TTC GAC AAA ATC AAG AAC TGG AGG AAC CTG ATC GCG		
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala		
771	786	801
GTG CTG GGC GAG CAC GAC CTC AGC GAG CAC GAC GGG GAT GAG CAG		
Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln		
816	831	846
AGC CGG CGG GTG GCG CAG GTC ATC ATC CCC AGC ACG TAC GTC CCG		
Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro		
861	876	891
GGC ACC ACC AAC CAC GAC ATC GCG CTG CTC CGC CTG CAC CAG CCC		
Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro		
906	921	936
GTG GTC CTC ACT GAC CAT GTG GTG CCC CTC TGC CTG CCC GAA CCG		
Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg		
951	966	981
ACC TTC TCT GAG AGG ACG CTG GCC TTC GTG CGC TTC TCA TTG GTC		
Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val		
996	1011	1026
AGC GGC TGG GGC CAG CTG GAC CGT GGC GCC ACG GCC CTG GAG		
Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu		
1041	1056	1071
CTC ATG GTC CTC AAC GTG CCC CGG CTG ATG ACC CAG GAC TGC CTG		
Leu MET Val Leu Asn Val Pro Arg Leu MET Thr Gln Asp Cys Leu		
1086	1101	1116
CAG CAG TCA CGG AAG GTG GGA GAC TCC CCA AAT ATC ACG GAG TAC		
Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr		
1131	1146	1161
ATG TTC TGT GCC GGC TAC TCG GAT GGC AGC AAG GAC TCC TGC AAG		
MET Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys		
1176	1191	1206
GGG GAC AGT GGA GGC CCA CAT GCC ACC CAC TAC CGG GGC ACG TGG		
Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp		
1221	1236	1251
TAC CTG ACG GGC ATC GTC AGC TGG GGC CAG GGC TGC GCA ACC GTG		
Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val		

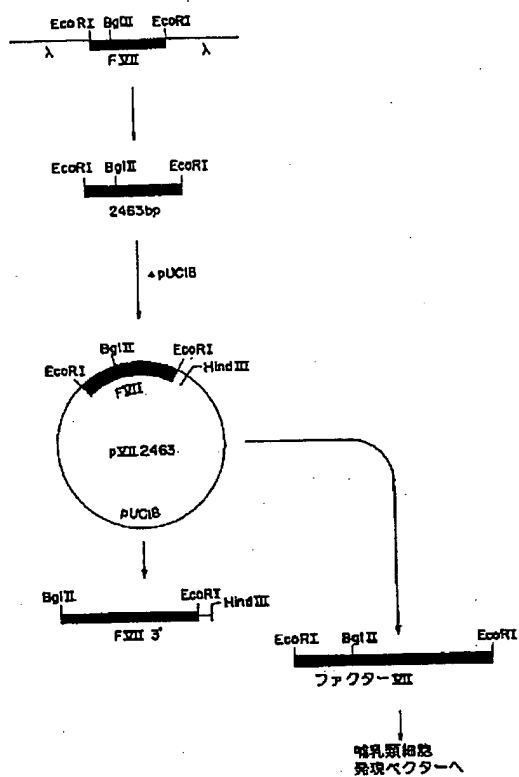
【図16】

1266	1281	1296
GGC CAC TTT GGG GTG TAC ACC AGG GTC TCC CAG TAC ATC GAG TGG		
Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp		
1311	1326	1341
CTG CAA AAG CTC ATG CGC TCA GAG CCA CGC CCA GGA GTC CTC CTG		
Leu Gln Lys Leu MET Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu		
1356	1378	1388
CGA GCC CCA TTT CCC TAG CCCAGCAGCC CTGGCCTGTG GAGAGAAAGC		
Arg Ala Pro Phe Pro		
1408	1418	1428
CAAGGCTGCG TCGAACTGTC CTGGCACCAA ATCCCATATA TTCTTCTGCA		
1458	1468	1478
GTTAATGGGG TAGAGGAGGG CATGGGAGGG AGGGAGAGGT GGGGAGGGAG		
1508	1518	1528
ACAGAGACAG AAACAGAGAG AGACAGAGAC AGAGAGAGAC TGAGGGAGAG		
1558	1568	1578
ACTCTGAGGA CCATGGAGAG AGACTCAAAG AGACTCCAAG ATTCAAAGAG		
1608	1618	1628
ACTAATAGAG ACACAGAGAT GGAATAGAAA AGATGAGAGG CAGAGGCAGA		
1658	1668	1678
CAGGCGCTGG ACAGAGGGGC AGGGGAGTGC CAAGGTTGTC CTGGAGGCAG		
1708	1718	1728
ACAGCCCAGC TGAGCCTCCT TACCTCCCTT CAGCCAAGCC CCACCTGCAC		
1758	1768	1778
GTGATCTGCT GGCCCTCAGG CTGCTGCTCT GCCTTCATTG CTGGAGACAG		
1808	1818	1828
TAGAGGCATG ACACACATGG ATGCACACAC ACACACGCCA TGCACACACA		
1858	1868	1878
CAGAGATATG CACACACACG GATGCACACA CAGATGGTCA CACAGAGTAC		
1908	1918	1928
GCAAACACAC CGATGCACAC GCACATAGAG ATATGCACAC ACAGATGCAC		

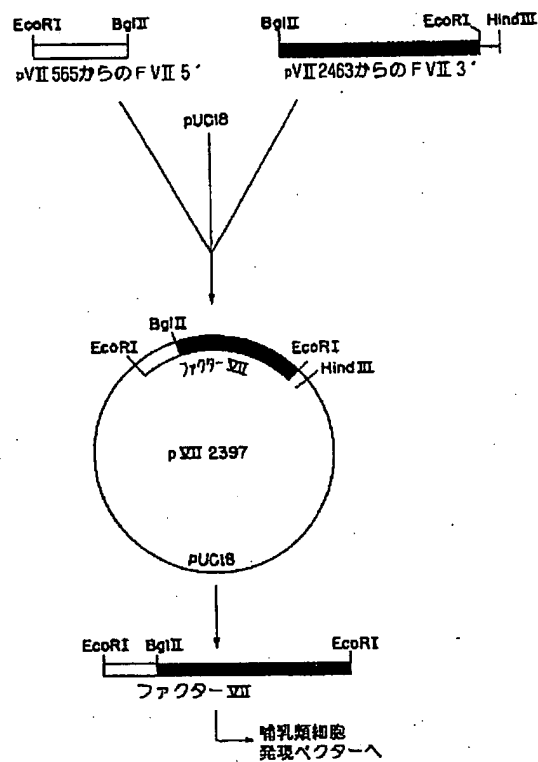
【図17】

1958	1968	1978	1988	1998
ACACAGATAT	ACACATGGAG	TGCACGCACA	TGCCAATGCA	CGCACACATC
2008	2018	2028	2038	2048
AGTGCACACG	GATGCACAGA	GATATGCACA	CACCGATGTG	CGCACACACA
2058	2068	2078	2088	2098
GATATGCACA	CACATGGATG	AGCACACACA	CACCAAGTGC	GCACACACAC
2108	2118	2128	2138	2148
CGATGTACAC	ACAGATGCAC	ACACAGATGC	ACACACACCG	ATGCTGACTC
2158	2168	2178	2188	2198
CATGTGTGCT	GTCCTCTGAA	GGCGGTTGTT	TAGCTCTCAC	TTTTCTGGTT
2208	2218	2228	2238	2248
CTTATCCATT	ATCATCTTCA	CTTCAGACAA	TTCAGAAGCA	TCACCATGCA
2258	2268	2278	2288	2298
TGGTGCGGAA	TGCCCCCAA	CTCTCCCCCA	AATGTATTTT	TCCCTTCGCT
2308	2318	2328	2338	2348
GGGTGCCGGG	CTGCACAGAC	TATTCCCCAC	CTGCTTCCCA	GCTTCACAAT
2358	2368	2378	2388	2398
AAACGGCTGC	GTCTCCTCGC	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA
2408	2418	2428	2438	
AAAAAAAAAA	AAGGAATTCT	AGCTCGGTAC	CCGGGGATCC	

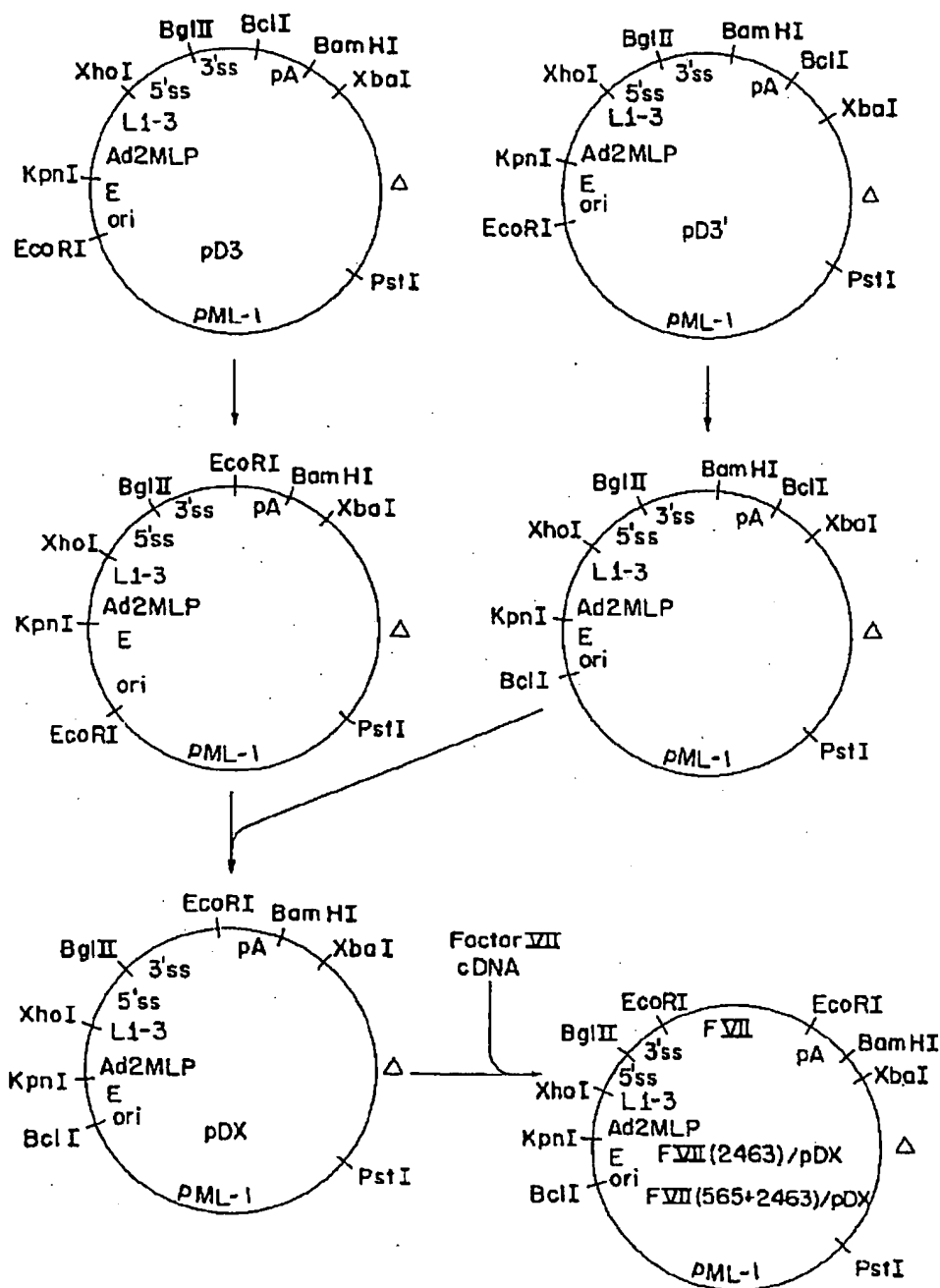
【図19】



【図21】



【図22】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

識別記号

FI

C12N 9/64

C12N 5/00

B

// A61K 38/43

ACA

A61K 37/465

ACA

(C12N 9/64

C12R 1:91)

- (72)発明者 マーク ジェイ. マリー
アメリカ合衆国, ワシントン 98102, シ
アトル, イレブンス アベニュー イース
ト, 2211
- (72)発明者 シャーロン ジェイ. バズビー
アメリカ合衆国, ワシントン 98103, シ
アトル, メリディアン ノース, 4109
- (72)発明者 キャスリーン エル. バークナー
アメリカ合衆国, ワシントン 98199, シ
アトル, トウェンティセカンド アベニュー
ウエスト, 3032

- (72)発明者 マーガレット ワイ. インスレー
アメリカ合衆国, ワシントン 98072, ウ
ッディンビル, ノース イースト, ワンハ
ンドレットフィフティース ストリート,
16860
- (72)発明者 リチャード ジー. ウッドベリー
アメリカ合衆国, ワシントン 98155, シ
アトル, ノース イースト, テンス アベ
ニュー, 15464
- (72)発明者 チャールズ エル. グレイ
アメリカ合衆国, ワシントン 98115, シ
アトル, ノース イースト, フォーティフ
ァースト アベニュー, 8014

